

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABEL BIASI YAMANAKA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFERRAMENTAS DIRECIONADAS
PARA O ALVO b2a2^{BCR-ABL1} COM APLICAÇÃO NO ESTUDO DA LMC

CURITIBA

2019

ISABEL BIASI YAMANAKA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFERRAMENTAS DIRECIONADAS
PARA O ALVO b2a2^{BCR-ABL1} COM APLICAÇÃO NO ESTUDO DA LMC

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira de Moura

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Larissa Magalhães Alvarenga

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Yamanaka, Isabel Biasi

Obtenção e caracterização de bioferramentas direcionadas para o alvo
b2a2BCR-ABL1 com aplicação no estudo da LMC. / Isabel Biasi
Yamanaka. – Curitiba, 2019.

111 p.: il.

Orientadora: Juliana Ferreira de Moura

Coorientadora: Larissa Magalhães Alvarenga

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

1. Leucemia mielogênica crônica BCR-ABL positiva 2. Peptídeos 3.
Clonagem molecular I. Título II. Moura, Juliana Ferreira de III. Alvarenga,
Larissa Magalhães IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

CDD (20. ed.) 575.10724



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de ISABEL BIASI YAMANAKA intitulada: **Obtenção e caracterização de bioferramentas direcionadas para o alvo b2a2BCR-ABL1 com aplicação no estudo da LMC**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

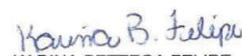
CURITIBA, 27 de Maio de 2019.


JULIANA FERREIRA DE MOURA
Presidente da Banca Examinadora


AMANDA RABELLO CRISMA
Avaliador Externo (UFPR)


SILVIA DANIELE RODRIGUES
Avaliador Interno Pós-Doc (UFPR)


ANA LÚCIA VIEIRA MION
Avaliador Externo (UFPR/HC)


KARINA BETTEGA FELIPE
Avaliador Externo (UFPR)

**Aos meus pais Vera (*in memoriam*) e
Geraldo.**

Ao meu irmão Rafael.

Ao meu amor Luiz Felipe.

**Por todo amor, por quem sou e
por tudo que alcancei.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade e aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo apoio financeiro;

À minha orientadora Prof^a. Dra. Juliana Ferreira de Moura, primeiramente, por ter confiado e me concedido a oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço por acrescentar conhecimento à minha formação;

À minha co-orientadora Prof^a. Dra. Larissa Magalhães Alvarenga pela contribuição em diversos momentos, contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho;

À banca avaliadora, pela disponibilidade e contribuições para melhoria deste trabalho;

Ao Dr. Roberto Rosati e Dr. Bonald de Cavalcante de Figueiredo do Instituto de pesquisa Pelé Pequeno Príncipe pela colaboração dos peptídeos sintetizados utilizados nesse estudo;

Ao professor Ricardo Machado-de-Ávila pela síntese da membrana de spot e ao professor Carlos Chavèz Ortegui por nos ceder o marcador FITC;

À J. K. Scott, pelas bibliotecas de fagos gentilmente concedidas e utilizadas nesse trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica: Alessandra, Camila, Carla, Guillermo, Isabella, Michele, Rafaela, Sabrina, Sarah, Chaara e Nicolle, por toda ajuda e companheirismo durante este período, principalmente às amigas feitas durante esta jornada: Ale, Carlinha e Sá que levarei para toda a vida;

Ao Laboratório de Genômica Funcional de Parasitos do departamento de Bioquímica, principalmente ao professor Wanderson e aos discentes José e Lisandro que nunca mediram esforços para me ajudar;

Aos demais docentes, discentes e servidores do Setor de Ciências Biológicas por toda ajuda prestada em diferentes situações, especialmente à Maíra, Juliana Azevedo, Silvia, Regiane, Juciliane, Fábio e Israel;

Às minhas amigas irmãs que a vida me deu: Camila, Juliana, Carolina, Daniella, Jullia, Patricia e Poliana. Obrigada por estarem sempre presentes ao longo desses anos;

Principalmente, à minha família por todo amor cedido, por me ensinarem os valores da vida e sempre guiarem o meu caminho para eu fazer as melhores escolhas possíveis. À minha mãe, minha guerreira, meu exemplo de vida e minha inspiração. Ao meu pai, meu orgulho, meu incentivador e meu protetor. Ao meu irmão Rafael, meu eterno amigo e parceiro. Ao meu amor Luiz Felipe, meu pilar que nunca mediu esforços para me apoiar. Amo vocês.

E, por fim, a todas às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa;

MUITO OBRIGADA!

“Todos os nossos sonhos podem-se realizar, se tivermos a coragem de persegui-los.”

- Walt Disney

RESUMO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) caracteriza-se pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph). A patogênese da doença é atribuída à proteína quimérica BCR-ABL1 formada, que possui atividade tirosina cinase continuamente ativa. Atualmente, para o diagnóstico e monitoramento destes pacientes são empregadas técnicas de biologia molecular a nível genético. Na tentativa de obter resultados mais precisos, diferentes abordagens têm sido propostas empregando a detecção da proteína BCR-ABL1 como um alvo bastante promissor. Esta proteína apresenta uma estrutura complexa e neste trabalho nós propomos a síntese apenas do peptídeo correspondente às regiões da fusão. No presente estudo, ligantes peptídicos foram selecionados a partir da técnica de *phage display* direcionados para o peptídeo representativo da região de fusão- b2a2 (pepb2a2). Foram identificados dois clones (13S e 25S) que apresentaram afinidade frente ao pepb2a2 dose-dependente, sendo que na concentração de 10^{10} TU/mL tiveram reatividades comparáveis ao do anticorpo anti-b2a2. O clone 13S apresentou-se mais promissor e teve sua sequência aminoacídica sintetizada. Este ligante peptídico de 17 aminoácidos (NMY) foi conjugado a diferentes moléculas para caracterização. A capacidade de ligação frente ao pepb2a2 foi mantida após a síntese química. As interações do NMY com os peptídeos correspondentes às fusões mais comuns foram caracterizadas a partir do ensaio de *spot synthesis*. Ainda, o NMY-FITC foi testado em um modelo celular para o reconhecimento da proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1}. Para tanto, foi necessária a construção de um vetor (Pb2a2) capaz de expressar b2a2^{BCR-ABL1} em células eucariontes. Em conclusão, este trabalho permitiu o desenvolvimento de dois insumos biotecnológicos para o avanço dos estudos da LMC- o ligante NMY e o vetor Pb2a2- que poderão ser utilizados como ferramentas em estudos futuros da LMC.

Palavras chaves: *phage display*; leucemia mieloide crônica; peptídeo; b2a2; BCR-ABL1.

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is characterized by the presence of the Philadelphia chromosome (Ph). Pathogenesis of the disease is attributed to the BCR-ABL1 protein with persistently active tyrosine kinase activity. Currently, techniques of molecular biology at the genetic level are used for diagnosis and monitoring of patients. In an attempt to obtain more accurate results, different types of performance indicators can be used to detect BCR-ABL1 protein as a very promising target. This protein presents a complex structure and in this study we propose the synthesis of the peptide corresponding only to the fusion regions. Peptide binders were selected from the phage display technique targeting the peptide representative of the fusion region-b2a2 (pepb2a2). Some clones (13S and 25S) had dose-dependent affinity with pepb2a2 and their reactivities were comparable to the anti-b2a2 antibody in the concentration of 10^{10} TU/ mL. 13S clone displayed best results and its amino acid sequence was synthesized. The 17 amino acids peptide (NMY) was conjugated to molecules for its characterization, without causing any losses to the binding capacity against pepb2a2. The interactions of NMY with peptides were characterized from the spot synthesis assay. In addition, NMY-FITC was tested in a cell system for recognition of the recombinant b2a2 BCR-ABL1 protein. A vector (Pb2a2) capable of expressing b2a2^{BCR-ABL1} in eukaryotic cells was synthesized for this assay. In conclusion, this work developed two biotechnological tools- NMY and vPb2a2 vector- for the advancement of CML studies.

Keywords: phage display; chronic myeloid leukemia; peptide; diagnosis; monitoring; minimal residual disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - TRANSLOCAÇÃO CROMOSSOMAL t(9;22)(q34;q11)	23
Figura 2 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA p160 ^{BCR}	25
Figura 3 - DOMÍNIOS DA SUPERFAMÍLIA DE TIROSINA-QUINASE. DOMÍNIOS DA SUPERFAMÍLIA DE TIROSINA-QUINASE.....	26
Figura 4 - DOMÍNIOS DA SUPERFAMÍLIA DE TIROSINA-QUINASE.....	27
Figura 5 - SÍTIOS DE QUEBRA NOS GENES BCR E ABL1 E SEUS TRANSCRITOS FORMADOS.....	29
Figura 6 - VIAS DE SINALIZAÇÃO ATIVADAS POR BCR-ABL1	31
Figura 7 – IMATINIB.....	33
Figura 8 - SÍTIOS DE MUTAÇÕES DO IMATINIB (STI571)	34
Figura 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS INIBIDORES DA TIROSINA-QUINASE.	35
Figura 10 - DEFINIÇÃO DE RESPOSTA AO TRATAMENTO PARA PACIENTES COM LMC.	37
Figura 11 - ESQUEMA DA SELEÇÃO POR PHAGE DISPLAY.....	47
Figura 12 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DOS FAGOS..	48
Figura 13 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DE REATIVIDADE.....	49
Figura 14 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DE COMPETIÇÃO	50
Figura 15 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DE REATIVIDADE NO NMY BIOTINILADO.....	55
Figura 16 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DE COMPETIÇÃO	56
Figura 17 - ESQUEMA DA DETECÇÃO DA PROTEÍNA BCR-ABL PELO NMY- FITC EM MODELO CELULAR.....	61
Figura 18 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MAPA E SEQUÊNCIAS DO VETOR P210 pcDNA3	62
Figura 19 - ALINHAMENTO DOS PRIMERS NAS SEQUÊNCIAS DE INTERESSE DO GENES	63
Figura 20 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA OBTENÇÃO DO VETOR PBlueScript CONTENDO A REGIÃO DE INTERESSE DA JUNÇÃO BCR COM ABL1 PROVENIENTE DO VETOR P210 pcDNA3.....	66
Figura 21 - VETOR PBlueScript MUTADO.....	68

Figura 22 - OBTENÇÃO DO VETOR Pb2a2 o vetor P210 pcDNA3	70
Figura 23 - REPRESENTAÇÃO DOS TRÊS PEPTÍDEOS (pepb2a2, pepb3a2 e pepe1a2)	76
Figura 24 - REATIVIDADE DOS FAGOS, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, FRENTE AO pepb2a2.	77
Figura 25 - ESPECIFICIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AO pepb3a2	78
Figura 26 - ESPECIFICIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AO pepe1a2	79
Figura 27 - ELISA DE COMPETIÇÃO ENTRE OS FAGOS QUE RECONHECEM pepb2a2 COM O ANTICORPO ANTI-b2a2.....	80
Figura 28 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO SDS-PAGE DOS PEPTÍDEOS pepb2a2, pepb3a2 E pepe1a2 CONJUGADOS À BSA	82
Figura 29 - ESPECIFICIDADE DO NMY BIOTINILADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AOS PEPTÍDEOS CONJUGADOS À BSA	83
Figura 30 – ELISA COMPETIÇÃO DO PEPTÍDEO NMY EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES COM O ANTICORPO ANTI-b2a2.....	84
Figura 31 – MEMBRANA DE α CD4.....	86
Figura 32 - SEMELHANÇA ENTRE RESÍDUOS AMINOACÍDICOS COMPARTILHADOS ENTRE OS PEPTÍDEOS	87
Figura 33 - MODELO DAS ESTRUTURAS CONFORMACIONAIS DOS pep..	88
Figura 34 - PERFIL DA ELETROFORESE CORRESPONDENTES APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA	89
Figura 35 - FRAGMENTO DOS CLONES OBTIDOS APÓS SEQUENCIAMENTO	90
Figura 36 - FRAGMENTOS CORRESPONDENTES AO α CD4.....	91
Figura 37 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE b2a2 BCR-ABL1.	93
Figura 38 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS EXTRATOS CELULARES.....	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS SINTETIZADAS EM CADA SPOT DA MEMBRANA.....	59
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCR-ABL	Gene <i>breakpoint cluster region</i> <i>translocation oncogene homolog</i>
BLAST	Gene <i>basic point mutation region</i>
BSA	Gene de fusão <i>breakpoint cluster region</i>
BCR-ABL1	Proteína quimérica BCR-ABL1
BLAST	Ferramenta bioinformática <i>basic local alignment search tool</i>
BSA	Albumina bovina <i>bovine serum albumin</i>
EDTA	Quelante ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
Fagos	Bacteriófagos
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
HRP	Enzima <i>horseradish peroxidase</i>
PBS	Tampão Fosfato Salina
PBS - T	Tampão Fosfato Salino com adição do detergente Tween 20
Ph	Cromossomo Philadelphia
p190	Proteína BCR-ABL1 de 190 kDa
p210	Proteína BCR-ABL1 de 210 kDa
p230	Proteína BCR-ABL1 de 230 kDa
rpm	Velocidade Rotação por minuto
SMCC	<i>succinimidyl 4-(dimethylamino)ethyl carbodiimide</i>

T (9;22)	Translocação cromossômica do 9 com o 22
TBS	Tampão Fosfato Tris
TBS – T	Tampão Fosfato Tris com adição de Tween 20
TU	Transpositional unit

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVO GERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 CROMOSSOMO PHILADELPHIA	22
2.2 LMC: CARACTERÍSTICAS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICAS	23
2.3. BCR E ABL1: SEUS PRODUTOS E FUNÇÕES FISIOLÓGICAS	25
2.4 TRANSLOCAÇÃO BCR-ABL1	28
2.5 PROTEÍNA ONCOGÊNICA BCR-ABL E SEUS MECANISMOS DE MALIGNIDADE	30
2.6 TRATAMENTO	31
2.6.1 Definições de resposta ao tratamento	36
2.6.2 Doença residual mínima (DRM)	37
2.7 DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO	38
2.8 PROTEÍNA BCR-ABL COMO ALVO NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO- TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS APLICADAS NO ÂMBITO DA LMC	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	42
3.2 SELEÇÃO DE LIGANTES PEPTÍDICOS POR PHAGE DISPLAY	42
3.2.1 Amplificação das bibliotecas de bacteriófagos	43
3.2.2 Seleção de ligantes peptídicos expressos na superfície de fagos-panning.	44
3.2.3 Screening dos clones por ELISA	47
3.2.4 Avaliação da reatividade e especificidade dos clones por ELISA	49

3.2.5 Avaliação da capacidade de competição dos fagos com o anticorpo monoclonal pelo pepb2a2.....	49
3.3 PROCESSAMENTO DO DNA VIRAL E SEQUENCIAMENTO DO CLONE 13S.....	50
3.3.1 Análise do sequenciamento.....	52
3.4 SÍNTESE DO PEPTÍDEO SOLÚVEL.....	52
3.4.1 Conjugação do ligante à diferentes moléculas	53
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO LIGANTE NMY POR ELISA.....	53
3.5.1 Conjugação e caracterização dos peptídeos das fusões ao BSA.....	53
3.5.2 Avaliação da reatividade e especificidade do ligante NMY	55
3.5.3 Avaliação da capacidade de competição do NMY pelo anticorpo monoclonal	56
3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES DO LIGANTE PEPTÍDICO POR SPOT E ALANINE SCANNING.....	57
3.6.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS SOBRE MEMBRANA DE CELULOSE ..	57
3.6.2 Reatividade do NMY-FITC frente aos peptídeos sintéticos lineares .	59
3.7 ANÁLISE DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS E DA CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL DAS FUSÕES	60
3.8 ENSAIO PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE b2a2 ^{BCR-ABL1} UTILIZANDO UM MODELO CELULAR	60
3.8.1 CONSTRUÇÃO DE UM VETOR CODIFICANTE PARA b2a2BCR-ABL1- Pb2a2	61
3.8.2 Primeira estratégia de deleção utilizando-se primers de 38 pares de bases	64
3.8.3 Segunda estratégia de deleção por clonagem da região a ser deletada em vetor menor PBlueScript (PBS)	65
3.8.3 Terceira estratégia de deleção por utilização de um megaprimer (394 pb)	67
3.8.4 Obtenção vetor Pb2a2 utilizando-se um vetor intermediário	69
3.8.5 Cultivo celular da linhagem HEK 293 T	70
3.8.6 Transfecção de células HEK 293 T com P210 pcDNA3 (b3a2) e Pb2a2 (b2a2)	71

3.8.7 Ensaio de imunofluorescência	72
3.8.7.1 Marcação da BCR-ABL citoplasmática de células em monocamadas (2D) para reação de fluorescência.....	72
3.8.7.2 Montagem lâminas.....	73
3.8.7.3 Análise microscopia confocal.....	73
3.8.8 DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE BCR-ABL1 POR WESTERN BLOTTING	74
4 RESULTADOS	75
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	75
4.2 SELEÇÃO DE FAGOS DE INTERESSE OBTIDOS NOS PANNINGS POR PHAGE DISPLAY- SCREENING	76
4.2.1 ENSAIO DE ESPECIFICIDADE.....	78
4.2.2 ENSAIO DE COMPETIÇÃO	79
4.3 SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DO PEPTÍDEO EXPRESSO PELO CLONE 13S.....	80
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DAS FUSÕES CARREADOS AO BSA.....	81
4.5 CARACTERIZAÇÃO CLONE 13S, APÓS SÍNTESE QUÍMICA E BIOTINILAÇÃO	82
4.4.1 Reatividade, por ELISA, do NMY biotinilado.....	82
4.4.2 Ensaio de competição do NMY biotinilado com o anticorpo monoclonal	83
4.5 REATIVIDADE DO NMY-FITC EM FASE SÓLIDA	84
4.6 ESTUDO DE BIOINFORMÁTICA DOS PEPTÍDEOS DAS FUSÕES	87
4.7 OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO b2a2 (Pb2a2)	88
4.7.1 Primeira estratégia de deleção- utilização de primers (38 pb)	88
4.7.2 Segunda estratégia de deleção- clonagem da região a ser mutada em vetor menor PBlueScript (PBS)	89
4.7.3 Terceira estratégia de deleção- utilização de um megaprimer (394 pb)	90
4.7.4 Quarta etapa- utilização vetor intermediário	91

4.8 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE Pb2a2 EM MODELO CELULAR E SUA DETECÇÃO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	92
4.9 DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE b2a2BCR-ABL PELO NMY-FITC EM MODELO CELULAR ATRAVÉS DA VISUALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	94
4.10 DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE b2a2BCR-ABL PELO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-b2a2 POR WESTERN-BLOTTING	94
DISCUSSÃO	96
6 CONCLUSÃO.....	103
7 PERSPECTIVAS.....	103
REFERÊNCIAS.....	104

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa com expansão clonal de células malignas. Caracteriza-se pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph) em 95% dos casos e está associado a uma anormalidade resultante da translocação recíproca t(9;22) (q34:11) que originia o oncogene $bcr-abl$. Este codifica a proteína BCR-ABL1 com atividade tirosina cinase continuamente ativa que é a principal responsável pela progressão da doença (Mughal et al., 2016).

A LMC foi a primeira neoplasia maligna hematológica associada a uma anormalidade genética específica. Este fato permitiu o uso de uma terapia dirigida no tratamento destes pacientes. Consequentemente, houve demanda por técnicas mais sensíveis e específicas para monitoramento durante o tratamento, de forma que recaídas sejam detectadas de forma precoce (Tohami, Nagler, & Amariglio, 2012).

Atualmente, as técnicas disponíveis para detecção das translocações e do cromossomo Philadelphia são baseadas em citogenética clássica e biologia molecular, devido sua sensibilidade e capacidade de diferenciar o tipo de translocação. No entanto, apresentam algumas limitações, como a necessidade de padronização pelo laboratório. Ainda, diferentes abordagens para a detecção e quantificação da proteína BCR-ABL1 têm sido reportadas uma vez que esta é a principal responsável pela progressão da doença, tornando-a um marcador bastante atrativo (Tohami et al., 2012; Vogel & Marcotte, 2013).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi selecionar possíveis ligantes peptídicos a partir da técnica de *phage display* direcionados à região de fusão da proteína b2a2^{BCR-ABL1} na tentativa de empregar estas bioferramentas no monitoramento dos pacientes. Ainda, foi desenvolvido um vetor capaz de expressar esta proteína recombinante que poderá ser amplamente empregada no estudo da LMC.

1.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar um ligante peptídico direcionado para a região representativa da fusão b2a2 (pepb2a2) para detecção da proteína BCR-ABL1 em modelo celular.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar fagos que expressam peptídeos reativos frente a região representativa da fusão b2a2 (pepb2a2) através de *phage display*;
- Caracterizar a afinidade e especificidade destes clones frente a outras fusões;
- Obter o ligante peptídeo por síntese química e conjugá-lo à diferentes moléculas marcadoras;
- Caracterizar a afinidade e especificidade do ligante peptídico frente a outras fusões;
- Caracterizar os sítios de interação do ligante peptídico com as fusões;
- Obter um vetor para expressão da proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1};
- Desenvolver um modelo celular para detecção da proteína BCR-ABL1 *in*

□it□

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CROMOSSOMO PHILADELPHIA

O cromossomo Philadelphia (Ph) foi descrito pela primeira vez na leucemia mieloide crônica em 1960 por Nowell e David Hungerford (Nowell, 1960), configurando a primeira alteração citogenética específica associada a um câncer humano. Trabalhos posteriores mostraram que o cromossomo anormal era um cromossomo 22 encurtado. Em 1973 foi descrito como a translocação recíproca de DNA entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, que resulta em um cromossomo 22 encurtado e um cromossomo 9 prolongado (Mughal et al., 2016; Rowley, 1973) (figura 1).

O cromossomo Philadelphia está presente nas células da medula óssea de 95% das pessoas com LMC e é a anormalidade citogenética mais frequente em pacientes idosos com leucemia linfocítica aguda (LLA). Neste último caso, está associado a um mau prognóstico, sendo as taxas de sobrevida a longo prazo de ~10 a 20% (Fakih et al., 2018).

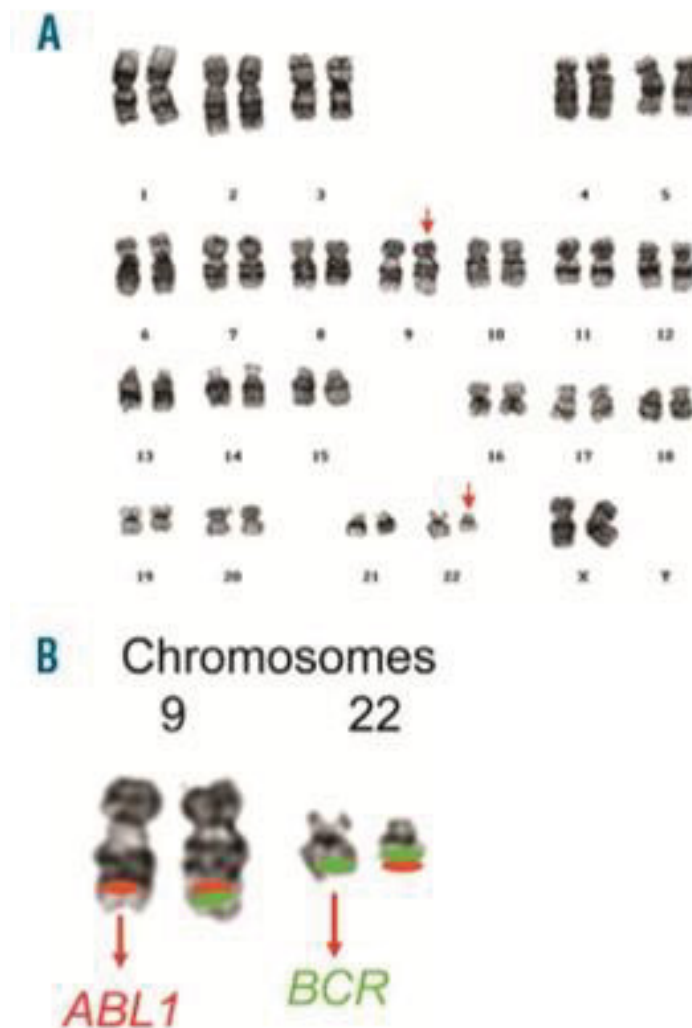


Figura 1 - TRANSLOCAÇÃO CROMOSSOMAL t(9;22)(q34;q11). A) Cariótipo de um paciente com leucemia mieloide crônica; Cromossomos anormais indicados com setas. B) Cariótipo parcial marcado com as sondas BCR e ABL1 por FISH; os sinais verde-vermelho indicam fusão dos cromossomos 9 e 22 (Mughal et al., 2016).

2.2 LMC: CARACTERÍSTICAS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICAS

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, clonal, caracterizada pela proliferação de células da linhagem granulocítica sem a perda de capacidade de diferenciação (REF OMS).

A LMC foi a primeira neoplasia maligna hematológica a estar associada a uma anormalidade genética específica devido uma translocação recíproca t (9; 22) (q34: 11) que resulta em um oncogene BCR-ABL1 que codifica uma proteína com alta atividade cinase contínua (Mughal et al., 2016). Este único produto oncogênico BCR-ABL1 gerado é o responsável pela patologia, acometendo as linhagens celulares hematopoiéticas, tanto mielóide (granulocítica, eritróide, monocítica e megacariocítica) quanto linfóide (menos comum) afetando principalmente o compartimento de granulócitos na medula óssea (Roskoski, 2003).

Além disso, a LMC representa 15-20% de todas as leucemias, com uma incidência mundial de um a dois casos por 100.000 habitantes, com predomínio em homens na relação de 3:2 mulheres. Variações étnicas e/ ou geográficas podem contribuir para a variabilidade entre os registros de incidência. A doença é encontrada em todas as faixas etárias, acometendo principalmente indivíduos entre 55 e 60 anos (Höglund, Sandin, & Simonsson, 2015);

A LMC pode ser classificada em três fases: fase crônica (FC), fase acelerada (FA) e fase blástica (FB). A maioria dos pacientes (90% -95%) encontra-se na fase crônica, sendo que nos Estados Unidos cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com LMC são assintomáticos e são freqüentemente diagnosticados durante um exame físico de rotina ou hemograma (Jabbour & Kantarjian, 2018; Team, 2018).

Dentre os sinais e sintomas comuns da fase crônica, quando presentes, pode-se citar a fadiga, perda de peso, mal-estar, saciedade fácil e plenitude ou dor no quadrante superior esquerdo do baço. Manifestações raras podem apresentar-se como sangramento (associado a baixa contagem de plaquetas e/ ou disfunção plaquetária), trombose (associada a trombocitose e/ ou leucocitose acentuada), artrite gotosa (a partir de níveis elevados de ácido úrico), priapismo (geralmente com leucocitose acentuada ou trombo). A esplenomegalia é o sinal físico mais consistente detectado em 40% - 50% dos casos; já a hepatomegalia é menos comum (menos de 10%) (Jabbour & Kantarjian, 2018).

2.3. BCR E ABL1: SEUS PRODUTOS E FUNÇÕES FISIOLÓGICAS

Na leucemia mieloide crônica, a fusão accidental do gene *bcr* com o gene *abl* (*breakpoint cluster region*) resulta na formação de uma proteína tirosina cinase ativada de maneira imprópria (Nagar et al., 2002).

O produto do gene *bcr* é uma molécula complexa com muitos motivos funcionais diferentes, envolvidos na fosforilação de proteínas e no sítio de ligação do GTP (figura 2) (Roskoski, 2003). A p160^{BCR} possui um domínio “coiled-coil”, também chamado de domínio de dimerização (DD). O primeiro éxon N-terminal do gene *bcr* codifica uma serina/ treonina cinase, classificando a BCR como uma proteína cinase atípica. Ainda, a proteína BCR pode ser fosforilada em vários resíduos de tirosina, especialmente no resíduo Tyr 177, que se liga a Grb-2 para ativação da via Ras (Deininger, Goldman, & Melo, 2000). Ao centro, encontram-se os domínios “*dbt-like*” e “*pleckstrin homology*” (PH) que possuem função GTPase, sugerindo um papel duplo para esta molécula nas vias de sinalização associadas à proteína G (Roskoski, 2003).

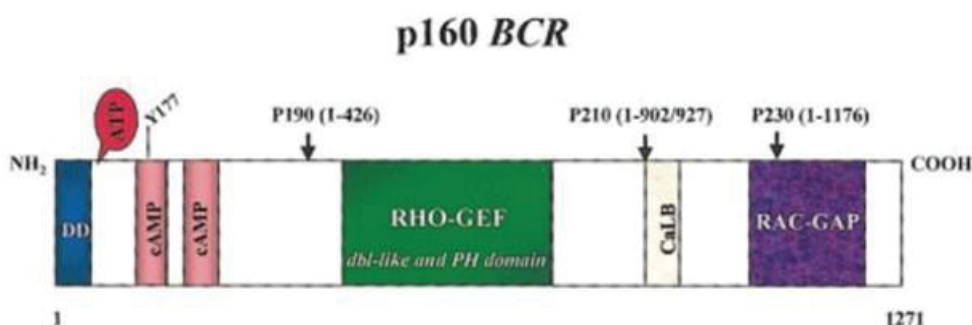


Figura 2 - ESTRUTURA DA PROTEÍNA p160^{BCR}. Destacando o domínio de dimerização (DD) e 2 domínios cAMP na região N-terminal e ao centro as regiões domínio “*dbt-like*” e “*pleckstrin homology*” (PH). As setas indicam os pontos de quebra na proteína BCR. (Deininger et al., 2000).

O gene *ABL1* é o homólogo humano do oncogene *ABL* do vírus Abelson da leucemia murina (A-MuLV) e codifica uma tirosina cinase. A ABL1 humana é uma proteína de 145 kDa expressa ubiquitinada, apresentando duas isoformas originadas do *splicing* alternativo do primeiro éxon (Deininger et al., 2000).

A c-ABL1 é uma proteína de tamanho elevado que apresenta 1150 aminoácidos. A porção NH2 desta proteína (~530 aminoácidos) possui 42% de identidade com a família de tirosina-cinases SRC e compartilha uma organização de domínio similar, composta por duas unidades modulares de ligação peptídica (os domínios SH2 e SH3) seguidas por um domínio de tirosina-cinase. A porção terminal COOH contém domínios de DNA e de ligação de actina intercaladas com sítios de fosforilação e segmentos ricos em prolina (figura 3) (Nagar et al., 2002).

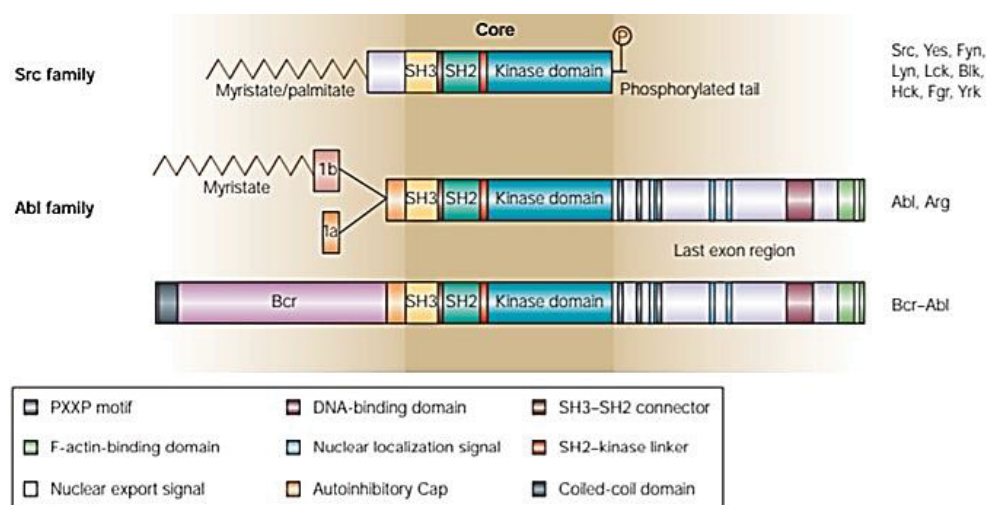


Figura 3 - ESTRUTURAS DE DOMÍNIO SH3 E SH2 NA SUPERFAMÍLIA DE TIROSINA-CINASE (adaptado de Hantschel & Superti-furga, 2004).

O c-ABL1 interage com proteínas reguladoras do ciclo celular, afetando a proliferação celular. O c-Abl1 é capaz de ligar-se ao DNA e pode estar envolvido

no início da transcrição, na resposta ao dano no DNA e nos processos meióticos (Roskoski, 2003).

As cinases ativas e inativas diferem quanto a conformação do *loop* de ativação. Quando estas enzimas estão em um estado ativo, o *loop* de ativação está em uma conformação estendida/ aberta e apresentam uma conformação compacta quando inativa (figura 4) (Roskoski, 2003).

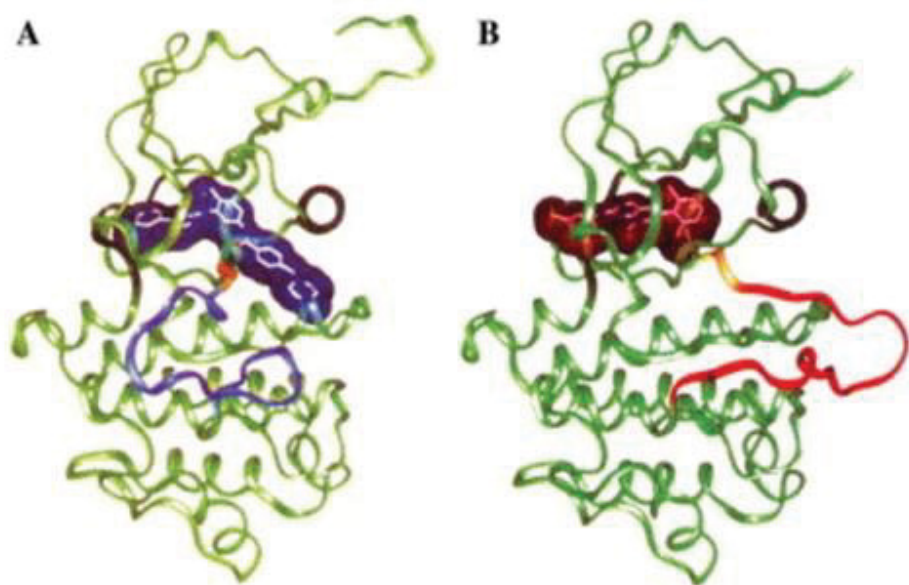


Figura 4 - DOMÍNIOS DA SUPERFAMÍLIA DE TIROSINA-CINASE. A) *loop* de ativação do domínio cinase inativo (roxo). B) *loop* de ativação do domínio cinase ativo (vermelho) (Roskoski, 2003).

A atividade cinase da c-ABL1 é muito baixa em condições normais. No entanto, a fusão de BCR ao NH2 terminal da c-Abl1 resulta na ativação da cinase por um mecanismo que não é bem compreendido (Nagar et al., 2002).

2.4 TRANSLOCAÇÃO BCR-ABL1

Os pontos de quebra dentro do gene ABL1 em 9q34 podem ocorrer em qualquer lugar em uma área maior que 300 kb da sua extremidade 5', podendo ocorrer anteriormente ao primeiro éxon alternativo 1b, posteriormente ao segundo éxon 1a e, mais frequente, entre os dois (Deininger et al., 2000). A fusão ocorre com o éxon a2 de BCR para os transcritos mais frequentes (Deininger et al., 2000).

No gene BCR os pontos de quebra se localizam em uma das três regiões chamadas de "breakpoint cluster region" (BCR-BCR). A maioria dos pacientes com LMC e aproximadamente um terço dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda Ph-positiva, a quebra ocorre em BCR-BCR ("major breakpoint cluster region") uma área de 5,8 kb (exons b1-b5 e renomeado para e12-e16). Frequentemente ocorre a formação dos transcritos de fusão com junções e13a2 (b2a2) ou e14a2 (b3a2) e, de maneira resultante, a formação da proteína quimérica p210^{BCR-ABL1} (210 kDa) (figura 5) (Mughal et al., 2016).

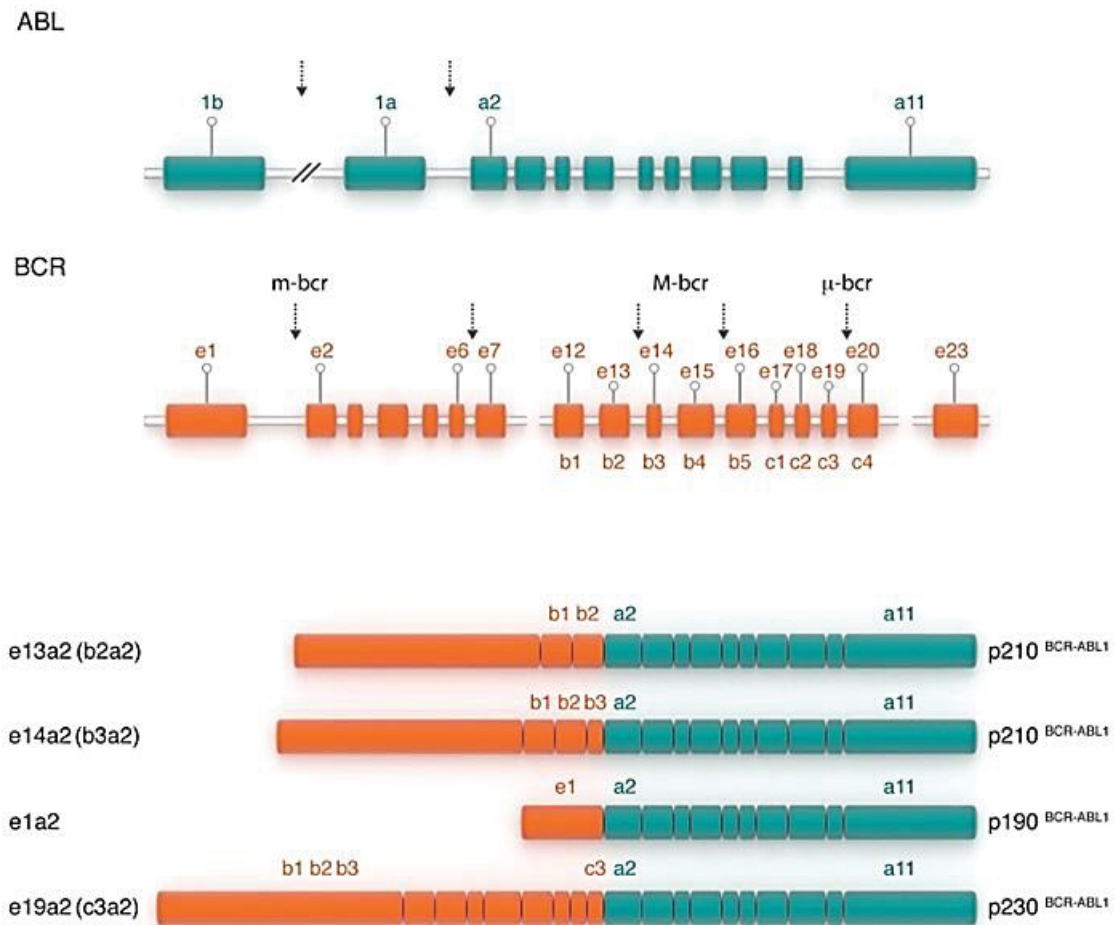


Figura 5 – ESTRUTURA DOS GENES DE $\square\square\square$ E $\square\square\square\square$ NORMAIS E OS TRANSCRITOS BCR-ABL1 FORMADOS. As setas indicam os possíveis locais de quebra dos genes e a formação dos diferentes transcritos (Mughal et al., 2016).

Os pacientes com LLA Philadelphia positivo e alguns pacientes com LMC podem apresentar a quebra em $\square\square\square$ entre o éxon e2' e e2- m- $\square\square\square$ ("minor breakpoint cluster region"), dando origem a uma proteína de 190 kDa (p190^{BCR-ABL1}) (Mughal et al., 2016) (figura 5). Ainda, foi identificada uma terceira região de quebra do "cluster": μ - $\square\square\square$ (próximo do éxon 19), dando origem a uma proteína de fusão de 230 kDa (p230^{BCR-ABL1}) associada à rara leucemia neutrofílica crônica Ph-positiva (Mughal et al., 2016).

Atualmente ainda existe muita discrepância do significado do prognóstico dos pacientes com LMC correlacionado ao tipo dos transcritos. Os transcritos mais comum encontrados nesses pacientes é o b2a2 (e13a2) e b3a2 (e14a2), podendo estes dois serem coexpressos. Diferentes estudos têm mostrado que não há implicação prognóstica e sobrevida global dos diferentes transcritos a partir dos parâmetro clínicos avaliados. Entretanto, pacientes com o transcrito b3a2 apresentaram maiores taxas de resposta citogenética completa após 6 meses e maior taxa de resposta molecular após 3 meses de tratamentos em comparação com o transcrito b2a2 ou com ambas as transcrições. O mecanismo biológico responsável por essa diferença não é conhecido e deve ser investigado em estudos futuros (Castagnetti et al., 2017; Farhat-maghribi, Habbal, & Monem, 2016; Azad et al., 2018; Borgia et al., 2017; Ercaliskan & Eskazan, 2018).

2.5 PROTEÍNA ONCOGÊNICA BCR-ABL1 E SEUS MECANISMOS DE MALIGNIDADE

A partir do oncogene $bcr-abl$ ocorre a formação de uma proteína com atividade cinase continuamente ativa. A BCR-ABL1 está localizada exclusivamente no citoplasma. Entretanto, a c-ABL1, que é expressa em todos os tipos de células e não apenas em células hematopoiéticas, está localizada tanto no citoplasma quanto no núcleo (Pendergast, 2002).

A atividade permanente da proteína oncogênica BCR-ABL1 é considerada o principal fator de progressão da LMC. A BCR-ABL1 ativa uma complexa rede de sinalização que envolve proteínas como Myc, Ras, proteínas do citoesqueleto e as vias fosfatidil inotisol 3' cinase (PI3K) e JAK / STAT (figura 6). Como consequência desta ativação ocorre a proliferação celular descontrolada, elevação da sobrevida das células hematopoiéticas, resistência da apoptose, diferenciação incompleta e mobilização de células progenitoras. Ainda, a BCR-ABL1 parece estar associada a alterações nos mecanismos de reparo do DNA,

fenilaminopirimidina modificada) (figura 7). Sendo que em 2000, esta molécula passou a ser usada na terapia de pacientes com LMC e que permanece até os dias atuais como tratamento inicial de pacientes com LMC recém-diagnosticados, diminuindo a mortalidade anual na LMC de 10% -20% para 1% -2% (Jabbour & Kantarjian, 2018).

O imatinibe atua inibindo competitivamente o ATP no sítio de ligação da oncoproteína BCR-ABL1, resultando na inibição da fosforilação de proteínas envolvidas na transdução de sinal celular. A molécula também bloqueia o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas e a tirosina cinase C-KIT (Jabbour & Kantarjian, 2018).

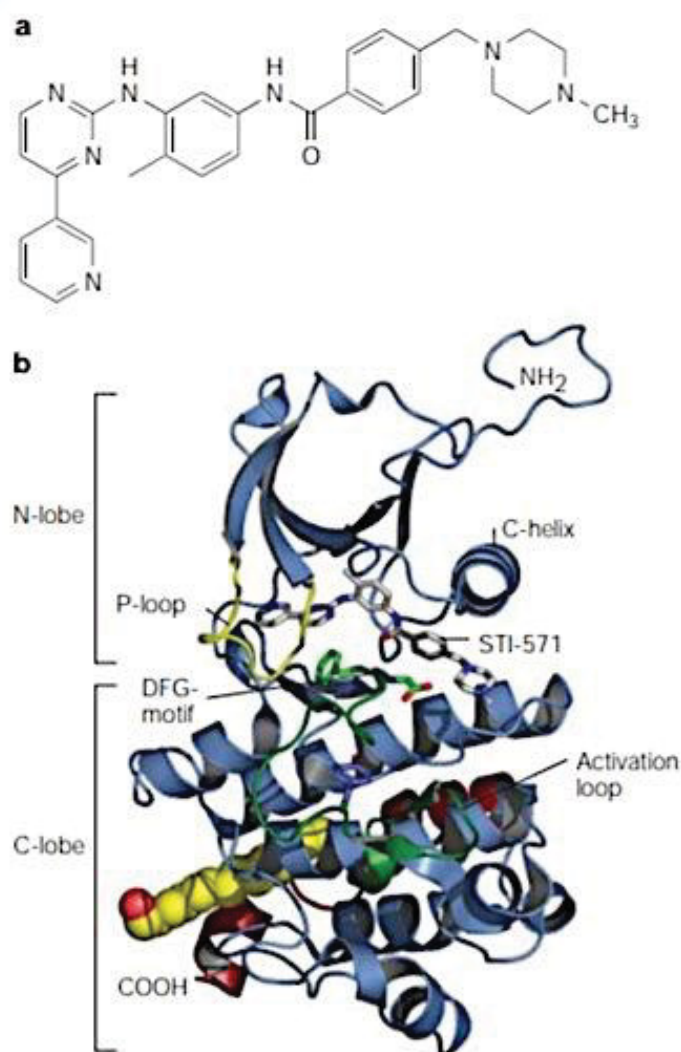


Figura 7 – ESTRUTURA REPRESENTATIVA DO IMATINIBE. A) Estrutura química do imatinib (STI571). B) Análise da estrutura cristalina do domínio cinase de ABL1 com o complexo do imatinib, mostrando que se liga na bolsade ligação com o ATP e força o loop de ativação (em verde) para uma conformação não fosforilada (Hantschel & Superti-furga, 2004).

No entanto, alguns paciente desenvolvem intolerância ou resistência a esses inibidores ao longo do tempo (Mughal et al., 2016). Estudos apontaram diversas mutações já encontrados em pacientes e possíveis pontos de resistência foram identificados utilizando um estudo de rastreo “in vitro” (figura 8) (Hantschel & Superti-furga, 2004).

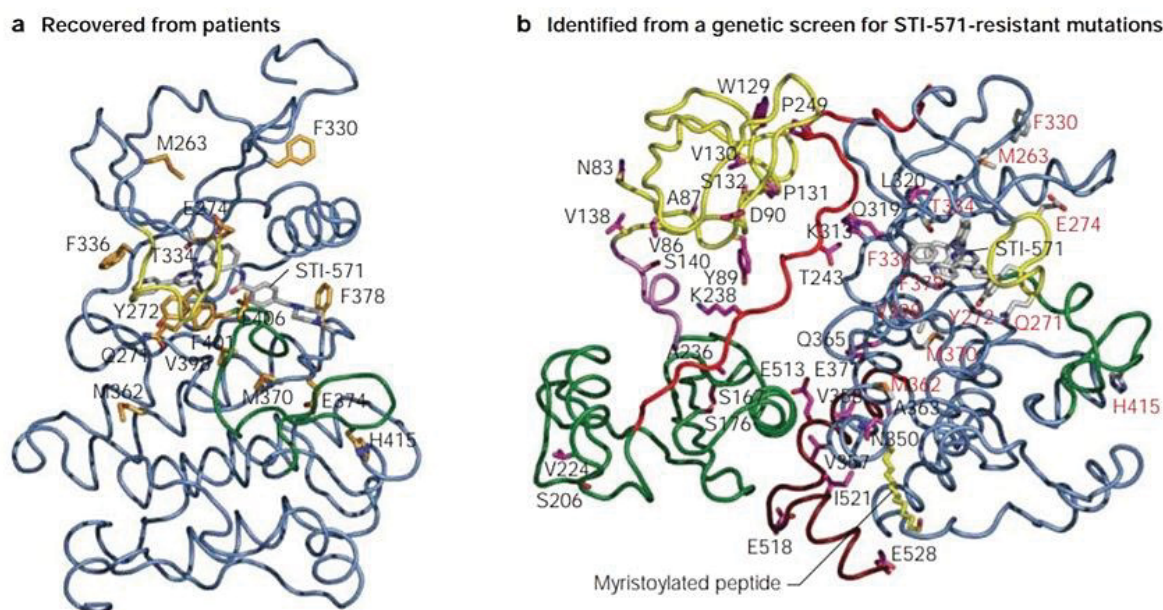


Figura 8 – POSSÍVEIS SÍTIOS DE MUTAÇÕES EM BCR-ABL1. A) Sítios de mutações em BCR-ABL1 verificados a partir de pacientes. B) Possíveis sítios de mutações relacionados à resistência e identificados por estudo de rastreio “in vitro” (Hantschel & Superti-furga, 2004).

Novos inibidores de segunda geração da tirosina cinase foram propostos, além de um inibidor de terceira geração, todos eles mais potentes que o imatinibe em ensaios in vitro. Dentre os fármacos de 2ª geração tem-se o nilotinibe (AMN107), o dasatinibe (BMS-354825) e mais recentemente o bosutinibe (SKI-606); e de terceira geração, o ponatinibe (AP24534) pode ser citado (figura 9) (Mughal et al., 2016).

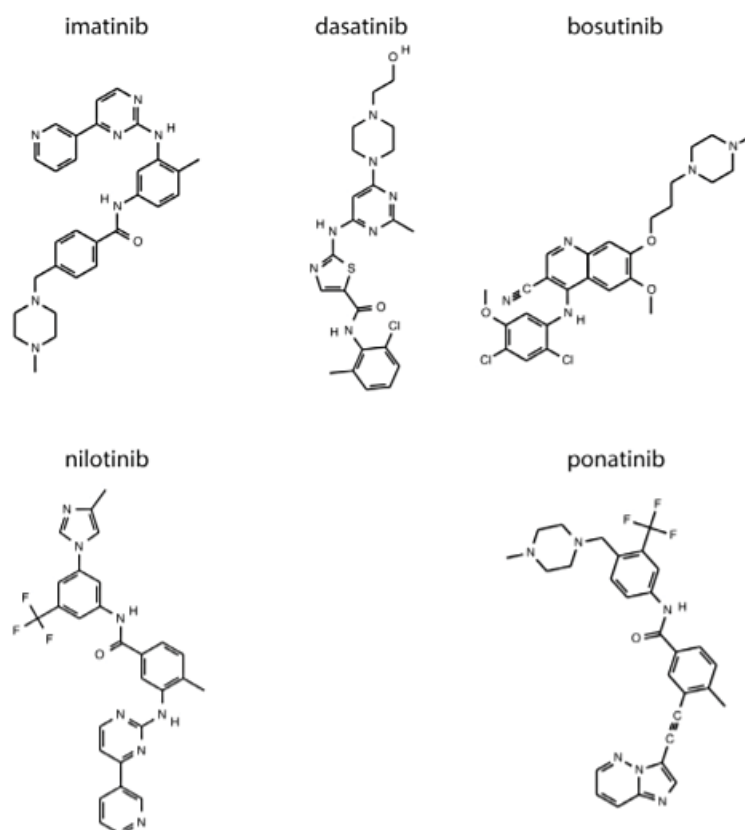


Figura 9 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS INIBIDORES DA TIROSINA-CINASE (Mughal et al., 2016).

O desenvolvimento do imatinibe e o emprego dos TKI revolucionaram o tratamento da LMC. Entretanto, ainda existe a necessidade de desenvolver novos análogos que possam atuar em caso de resistência aos fármacos disponíveis. Ainda, o desenvolvimento de fármacos que apresentem baixa ou nenhuma toxicidade é necessário, visto que a farmacoteria destes são de uso contínuo (Azevedo, Bastos, Oliveira, & Boechat, 2017).

O número de pacientes em fase crônica submetidos ao transplante de células-tronco alogênicas (alo-TCTH) teve uma diminuição significativa desde a introdução dos TKIs. Entretanto, esse número poderá se elevar novamente à medida que a resistência aos TKI aumente gradativamente. Já pacientes em fase acelerada (FA) ou blástica (FB) podem receber terapia inicial com TKIs para

reduzir a carga de LMC e ser considerado, precocemente, o alo-TCTH (Jabbour & Kantarjian, 2018).

2.6.1 Definições de resposta ao tratamento

Devido à introdução da terapia com TKI, houve um aumento significativo dos pacientes com LMC, sendo cada vez mais importante o emprego no diagnóstico e monitoramento da resposta à terapia. A resposta ao tratamento pode ser definida no que se refere aos níveis hematológico, citogenético e molecular. (figura 10) (Baccarani et al., 2013; Mughal et al., 2016).

A resposta hematológica é definida com a normalização das contagens celulares com leucócitos abaixo de $10.000/\text{mm}^3$, basófilos abaixo de 5%, plaquetas inferior a $450.000/\text{mm}^3$ e ausência de células imaturas (a partir de mielócitos) no sangue periférico (BRASIL, 2014).

A resposta citogenética pode ser considerada completa quando há a ausência total do cromossomo Philadelphia; parcial quando verificado 1%-35% de metáfases com cromossomo Philadelphia; menor com 36%-65% de metáfases com cromossoma Philadelphia; mínima com 66%-95% de metáfases com cromossomo Philadelphia ou ausente com mais de 95% de metáfases com cromossomo Philadelphia (BRASIL, 2014).

A resposta molecular pode ser considerada completa quando o transcrito BCR-ABL1 é indetectável, maior quando há a redução da quantificação dos transcritos igual ou superior a 3 log, conforme Escala Internacional de mRNA do BCR-ABL1 ou incompleta quando a relação BCR-ABL1/ABL1 é superior a 0,1% (BRASIL, 2014).

	Optimal	Warning	Failure
Baseline	NA	High risk Or CCA/Ph+, major route	NA
3 mo	BCR-ABL1 $\leq 10\%$ and/or Ph+ $\leq 35\%$	BCR-ABL1 $> 10\%$ and/or Ph+ 36-95%	Non-CHR and/or Ph+ $> 95\%$
6 mo	BCR-ABL1 $< 1\%$ and/or Ph+ 0	BCR-ABL1 1-10% and/or Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 $> 10\%$ and/or Ph+ $> 35\%$
12 mo	BCR-ABL1 $\leq 0.1\%$	BCR-ABL1 $> 0.1-1\%$	BCR-ABL1 $> 1\%$ and/or Ph+ > 0
Then, and at any time	BCR-ABL1 $\leq 0.1\%$	CCA/Ph- (-7, or 7q-)	Loss of CHR Loss of CCyR Confirmed loss of MMR* Mutations CCA/Ph+

Figura 10 - RESPOSTA AO TRATAMENTO PARA PACIENTES COM LMC (Baccarani et al., 2013).

2.6.2 Doença residual mínima (DRM)

Nos regimes terapêuticos usuais, pode-se obter uma resposta citogenética completa para a maioria dos pacientes; porém uma pequena proporção destes ocorrerá recidiva da doença. A presença de uma população celular maligna persistente em número abaixo do limite de detecção pelas técnicas padrão é definida como doença residual mínima (DRM) (Frazer, Irvine, & McMullin, 2007).

Atualmente as técnicas para detecção da DRM possuem limitações. Idealmente, deveriam apresentar sensibilidade em uma faixa entre 10^5 e 10^6 células, ser aplicável a quase todos os pacientes com a doença, fornecer informações sobre o alvo, serem baratos, rápidos, prontamente padronizados e específicos para a doença (Frazer et al., 2007).

2.7 DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO

Atualmente o diagnóstico de LMC consiste na avaliação do quadro de leucocitose persistente inexplicada (ou ocasionalmente trombocitose), na detecção da anormalidade cromossômica Philadelphia, na identificação da t(9; 22) (q34; q11) por citogenética de rotina, na identificação do BCR-ABL1 por hibridização fluorescente “in situ” (FISH) ou por estudos moleculares (Jabbour & Kantarjian, 2018).

O cromossomo Ph é identificado através do cariótipo, sendo a única anormalia na maioria das vezes.

A análise de FISH baseia-se na co-localização de grandes sondas específicas para os genes BCR e ABL1 . A comparação simultânea de amostras de medula e de sangue pela análise de FISH mostra alta concordância. Os estudos de FISH podem ter um intervalo falso positivo de 1 a 5%, dependendo das sondas utilizadas (Jabbour & Kantarjian, 2018).

A reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) localiza a região em torno da junção de emenda entre BCR e ABL1 . Apresenta alta sensibilidade na detecção de doença residual mínima. O teste de PCR pode ser qualitativo (qPCR), fornecendo informações sobre a presença do transcrito BCR-ABL1 ou quantitativo, avaliando a quantidade de transcritos BCR-ABL1 . A PCR qualitativa é útil para diagnosticar a LMC. Já a PCR quantitativa em tempo real é ideal para monitorar a doença residual. Estudos simultâneos de qPCR de sangue periférico e medula são correspondentes. Podem ocorrer resultados

falso-positivos e falso-negativos, sendo os resultados falso-negativos decorrentes de RNA de baixa qualidade ou falha da reação e os resultados falso-positivos podem ser devido à contaminação. Ainda, cerca de 2 a 5% dos doentes possuem outros tipos de transcritos atípicos, sendo e13a3 ou e14a3 (e não e13a2 ou e14a2) e podem originar um PCR falso negativo utilizando as sondas de rotina (Jabbour & Kantarjian, 2018).

Alem disso, os desafios também permanecem no acompanhamento de pacientes com LMC em tratamento, em especial a respeito da discrepância interlaboratorial nos resultados e na adequação dos resultados ao padrão internacional. Ainda, o monitoramento se beneficiaria ao ser simplificado e mais acessível (Mughal et al., 2016).

2.8 PROTEÍNA BCR-ABL1 COMO ALVO NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO- TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS APLICADAS NO ÂMBITO DA LMC

Ao longo de um curto período de tempo, muitos avanços na biologia do câncer permitiram uma extensa caracterização da LMC que agora é utilizada como um "modelo" de câncer devido ao sucesso da terapia específica (Mughal et al., 2016). No entanto, a compreensão dos mecanismos e o tratamento de pacientes na fase avançada da doença ainda permanece limitado.

A proteína BCR-ABL1 é a principal responsável pelo desenvolvimento da LMC e, portanto se mostra como um alvo bastante promissor para o diagnóstico e monitoramento desta doença.

Diversos grupos vêm desenvolvendo e aprimorando diferentes abordagens, sejam elas *in vitro* ou *in vivo* para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesta doença.

Inicialmente, a partir da extração do cDNA da linhagem celular K562 foram obtido clones contendo as sequências de codificação completas para o produto

P210 (Mes-masson, Mclaughlin, Daleyt, Paskindt, & Witte, 1986). Mais tarde, estes foram utilizados para uma construção retroviral para induzir a expressão da proteína em modelo murino (Daley, Erren, & Baltimore, 1989; B. X. Zhang & Ren, 1998).

Apesar do êxito no desenvolvimento modelos murinos para avaliar a patogênese da LMC de uma forma mais próxima do que acontece no curso natural da doença, o contínuo desenvolvimento de construções genéticas têm resultado em mutantes para testar as sinalizações envolvidos na doença (He et al., 2002). Além disso, é indispensável a avaliação de alguns parâmetros em modelos *in vitro*, como mudanças na adesão celular, para investigar o mecanismo pelo qual a proteína P210 BCR-ABL1 causa anomalias contribui para o desequilíbrio entre a proliferação e a auto-renovação no compartimento de progenitores hematopoiéticos (Wolff & Jr, 2001; Wertheim et al., 2002).

Outros grupos vêm abordando a proteína BCR-ABL1 como um alvo bastante promissor para o diagnóstico e monitoramento dos pacientes em diferentes vertentes, como por exemplo: citometria de fluxo (Raspadori et al., 2019, Löf et al., 2017, Dasgupta et al., 2017, Recchia et al., 2015), *quant dots*, *droplet digital* PCR (dd-PCR) (Zheng, Liu, Zhao, Xu, & Wang, 2018), nanopartículas detectadas por LDI-TOF MS (Hong, Kim, Kang, Yoon, & Kim, 2014), entre outros. Ainda, alguns grupos abordam a quantificação da atividade desta proteína cinase utilizando peptídeos capazes de penetrar em células e a quantificação desta é realizada por um espectrômetro de massa (T. Yang, Eissler, Hall, & Parker, 2013).

A maioria destas técnicas de detecção baseiam-se no emprego de anticorpos monoclonais já muito bem estabelecidos (Zhao et al., 2015). Entretanto, novas moléculas têm sido empregadas como bioferramentas, como os peptídeos. Estes apresentam uma série de vantagens em relação aos anticorpos, devido sua facilidade de identificação e síntese química, além de possibilitar modificações e conjugações com diferentes moléculas (David et al., 2018).

Estudos envolvendo diferentes patologias utilizam proteínas recombinantes como uma importante ferramenta na tentativa de compreender

os mecanismos envolvidos nestes processos biológicos. Para obtenção destas proteínas recombinantes é importante avaliar o sistema para expressão adequado dependendo das características, aplicação pretendida e quantidade da proteína de interesse. Apesar do grande avanço dos sistemas de expressão bacteriano nos últimos anos, este ainda é falho em algumas modificações pós-traducionais encontradas em eucariotos (Brondyk, 2009).

Portanto, é de suma importância continuar a pesquisa de novas terapias buscando melhorar a erradicação da doença residual mínima, avançar no entendimento dos eventos fisiopatológicos da BCR-ABL1 e aprimorar o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e monitoramento (Jabbour & Kantarjian, 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Foram adquiridos peptídeos de 13 aminoácidos correspondentes as regiões de fusão b2a2 p210^{BCR-ABL1} (pepb2a2, IPLTINKEEALQR), b3a2 p210^{BCR-ABL1} (pepb3a2, GFKQSSKALQRPV) e e1a2 p190^{BCR-ABL1} (pepe1a2, GAFHGDAEALQRP). As sequências foram sintetizadas pela empresa Peptron (Daejeon, Coréia do Sul) e Aminotech (São Paulo, Brasil) contendo uma cisteína na porção N-terminal para permitir o carreamento destas a diferentes moléculas. A aquisição dos peptídeos são procedentes de uma colaboração com o Dr. Roberto Rosati e Dr. Bonald de Cavalcante de Figueiredo do Instituto de pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba-PR.

3.2 SELEÇÃO DE LIGANTES PEPTÍDICOS POR ϕ 11

A técnica de *phage display* foi realizada durante o período do Mestrado com a finalidade de identificação de ligantes peptídicos para o pepb2a2, descrita por Smith (Smith, 1985).

Esta ferramenta consiste na realização de seleções *in vitro* (*pannings*) na qual bibliotecas randômicas de bacteriófagos são apresentadas a um alvo imobilizado em uma superfície, a fim de se identificar clones de interesse. Nesse caso, o peptídeo correspondente à translocação b2a2 p210^{BCR-ABL1}, chamado aqui para frente de pepb2a2, foi a molécula imobilizada para a seleção de peptídeos com afinidade via *phage display*.

3.2.1 Amplificação das bibliotecas de bacteriófagos

Para a seleção de ligantes capazes de reconhecer o peptídeo representativo da fusão b2a2 (e14a2) da proteína p210 BCR-ABL1 expressa na LMC foram utilizadas bibliotecas de bacteriófagos. Essas bibliotecas expressam peptídeos randômicos de 8, 12, 15 e 17 aminoácidos, denominadas LX-4, X15, LX-8 e X8CX8 (na qual X representa aminoácidos recombinantes e C um resíduo de cisteína), respectivamente. As bibliotecas utilizadas para este trabalho foram gentilmente cedidas por J. Scott, Universidade de Simon Fraser, Canadá (Bonnycastle, Mehroke, Rashed, Gong, & Scott, 1996).

Essas bibliotecas, foram amplificadas individualmente para posterior utilização nos *pannings*. Inicialmente estriou-se *Escherichia coli* K91 em meio LB sólido e incubou-se *overnight* a 37 °C. Preparou-se um pré-inóculo a partir de uma colônia isolada de *Escherichia coli* K91 em 10 mL de meio LB líquido e incubou-se *overnight* a 37 °C a 250 rpm. O inóculo foi realizado a partir dos 10 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio LB líquido, o qual foi incubado até atingir absorbância de 1,8 em comprimento de onda de 550 nm e deixado por 30 minutos a 37 °C a 50 rpm para formação dos *pili*. A indução foi realizada com a infecção dos fagos nas bactérias *Escherichia coli* K91 com a adição de 10^{11} TU/mL da biblioteca em 100 mL da cultura de bactérias *Escherichia coli* K91 foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente com agitação a cada 2 minutos. Para a amplificação, dividiram-se 100 mL da cultura de bactérias *Escherichia coli* K91 infectadas em 2 Erlenmeyer contendo 200 mL de meio LB líquido cada um contendo 0,4 µg/mL de antibiótico tetraciclina. O sistema foi incubado por 30 minutos a 37 °C a 250 rpm. Ajustou-se a concentração de antibiótico tetraciclina para 20 µg/mL e incubou-se *overnight* a 37 °C a 250 rpm.

A cultura de bactérias *Escherichia coli* K91 infectada foi dividida em tubos Nalgene estéreis e submetidas à centrifugação por 20 minutos a 4 °C a 4000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante e transferiu-se o mesmo para tubos Nalgene estéreis, aos quais adicionou-se 15% da solução de PEG 8000 [20% 2,5 M NaCl] e incubou-se em gelo *overnight* a 4 °C para precipitação dos fagos. Os tubos foram submetidos a uma nova centrifugação por 40 minutos a 4 °C e 8000 rpm,

descartando-se o sobrenadante e utilizando 7,5 mL de TBS [tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,5] para ressuspender o *pellet*. Após incubação por 30 minutos a 37 °C a 150 rpm a solução foi transferida para microtubos e centrifugada por 10 minutos a 4 °C a 15000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril, ao qual foram adicionados 15% da solução de PEG 8000/ NaCl incubando-se *o* *e* *n*ight em gelo a 4 °C.

Os fagos foram transferidos para microtubos e centrifugados por 40 minutos a 4 °C a 10.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi recuperado em 1,5 mL no total de TBS. Após nova centrifugação de 10 minutos a 4 °C a 1500 rpm, a solução foi filtrada em filtro 0,22 µm previamente umedecido com TBS, recolhida em microtubos e congelada para posterior titulação.

Novamente preparou-se um pré-inóculo a partir de uma colônia de *E. coli* K91 em 10 mL de meio LB líquido e incubado *o* *e* *n*ight a 37 °C a 250 rpm. O inóculo foi realizado a partir dos 10 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio LB líquido e incubado até atingir densidade ótica de 1,8 em comprimento de onda de 550 nm e deixado por 30 minutos a 37 °C a 50 rpm para formação dos *pili*. A titulação foi realizada a partir de diluições seriadas dos fagos em meio LB líquido, a partir de 10 µL dos fagos em 100 µL de meio LB líquido. Posteriormente, 10 µL das diluições 10⁶, 10⁸ e 10¹⁰ foram separadas para infectar individualmente 200 µL da cultura de *E. coli* K91, a qual se encontrava em fase exponencial. As bactérias foram incubadas por 15 minutos a 37 °C sem agitação e 15 minutos a 37 °C a 250 rpm. De cada diluição, foram plaqueados 200 µL em meio LB sólido contendo tetraciclina a 20 µg/mL cujas placas foram incubadas *o* *e* *n*ight a 37°C.

3.2.2 Seleção de ligantes peptídicos expressos na superfície de fagos- *panning*

A seleção de ligantes peptídicos foi realizada de acordo com Scott & Smith (1990), com algumas modificações propostas por Capelli-peixoto et al. 2011 e Lunder, Mojca Bratkovic, Tomaz Urleb & Kreft, Samo Strukelj, 2008 para obtenção de clones com maior afinidade e especificidade.

Durante o Mestrado, foram testadas diferentes estratégias para verificar qual seria a melhor delas para selecionar ligantes utilizando um peptídeo como alvo. A partir destes resultados, foi definido a utilização de de 10 µg/mL de pepb2a2 diluído em *coating buffer* (NaHCO₃ 100 mM, pH 8,6) durante 48 horas a 4 °C para imobilização em uma microplaca de 96 poços (Nunc-Immuno, MaxiSorp F96, NUNC Brand Products, Roskilde, Dinamarca) como superfície. Após o período de imobilização, a placa ficou 2 horas sob agitação a 37 °C e lavada 5 vezes por 2 minutos com tampão de lavagem TBS-T 0,05%.

Para bloqueio, incubou-se com uma solução de bloqueio TBS-T 0,05% [contendo 3% BSA, previamente filtrada a 0,22 µm] por 2 horas sob leve agitação. A placa foi lavada conforme descrito anteriormente.

Em seguida foram adicionadas 10¹¹ TU/mL das bibliotecas de fagos LX-4 e X8CX8 e 10¹⁰ TU/mL das bibliotecas LX-8 e X15 diluídas em 10 mL de TBS-T 0,05% e incubadas *overnight* a 4°C. Preparou-se um pré-inóculo em um tubo de 50 mL contendo 10 mL de meio LB e utilizando uma colônia isolada da bactéria *E. coli* K91, a 37°C sob agitação de 225 rpm *overnight*.

A eluição dos ligantes foi realizada utilizando a estratégia descrita por Lunder, Mojca Bratkovic, Tomaz Urleb & Kreft, Samo Strukelj, 2008 que consistiu na realização de 10 lavagens de 2 minutos com TBS-T 0,2% e, posteriormente, com 5 lavagens de 2 minutos com TBS-T 0,05% para retirar os fagos que não ligaram. A placa foi lavada 4 vezes com tampão glicina [glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2 contendo BSA 1 mg/mL, previamente filtrado a 0,22 µm] por 5 minutos sob agitação. Os fagos que se ligaram ao peptídeo foram recuperados com eluição ácida com sonicação, no qual foi realizada a adição de 100 µL/poço de tampão glicina [glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2 contendo BSA 1 mg/mL, previamente filtrado a 0,22 µm] recoberta por um adesivo e imersa em banho-maria (50 Hz) durante 10 minutos.

Desta forma, os fagos que se ligaram ao peptídeo foram recuperados e recolhidos em um tubo Falcon e a solução neutralizada (pH 7,0) com Tris-HCl [1 M pH 9,0]. Foi retirada uma alíquota de 20 µL para posterior titulação parcial dos fagos.

Preparou-se um pré-inóculo a partir de uma colônia de *E. coli* K91 em 10 mL de meio LB líquido o qual foi incubado *overnight* a 37 °C a 250 rpm. O inóculo foi realizado a partir dos 10 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio LB líquido e incubado até atingir densidade ótica de 1,8 no comprimento de onda de 550 nm e deixado por 30 minutos a 37 °C a 50 rpm para formação dos *pili*.

Para a infecção dos fagos nas bactérias os 10 mL da solução de fagos recuperados foi dividida em dois tubos, nos quais foram adicionados 8,5 mL de cultura de bactérias K91 previamente preparadas e incubadas durante 10 minutos sem agitação. As soluções foram colocadas em 100 mL de meio LB contendo 0,02 µg/mL de tetraciclina e então deixadas por 30 minutos sob rotação de 225 rpm para obter a indução, posteriormente ajustada à concentração final de tetraciclina para 20 µg/mL e incubou-se *overnight* a 37 °C a 225 rpm.

Transferiu-se o conteúdo para um tubo Nalgene estéril e centrifugou-se o volume total a 4000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Nalgene estéril e adicionado 20% de PEG 8000. Agitou-se o tubo por inversão e incubou-se em gelo *overnight* a 4 °C para precipitação dos fagos. Preparou-se um pré-inóculo em um tubo de 50 mL contendo 10 mL de meio LB utilizando uma colônia isolada da bactéria *E. coli* K91, a 37 °C sob agitação de 225 rpm *overnight*.

O tubo contendo os fagos para precipitação foi centrifugado por 40 minutos a 4°C a 8000 rpm e eliminou-se o sobrenadante. O precipitado foi recuperado em 3 mL de solução TBS e incubado por 30 minutos a 37 °C a 150 rpm. Transferiu-se para microtubos e foram centrifugados por 10 minutos a 15000 rpm a 4 °C para eliminar os possíveis restantes celulares. Foram retirados 20 µL para posterior titulação e o restante foi congelado.

Foi realizado um pré-inóculo a partir de uma colônia de *E. coli* K91 em 10 mL de meio LB líquido e incubado *overnight* a 37 °C a 250 rpm. O inóculo foi realizado a partir dos 10 mL do pré-inóculo em 100 mL de meio LB líquido, incubado até atingir densidade ótica de 1,8 em 550 nm e deixado por 30 minutos a 37 °C a 50 rpm para formação dos *pili*.

Infectaram-se 200 μL das bactérias K91 previamente preparadas com 10 μL de cada uma das diluições de fagos. Incubou-se por 15 minutos a 37 °C sem agitação e posteriormente por mais 15 minutos a 37 °C a 225 rpm. Utilizou-se 200 μL das bactérias infectadas para titulação e plaqueou-se em LB sólido contendo 20 $\mu\text{g/mL}$ e as placas foram deixadas overnight a 37 °C. No dia seguinte, contou-se o número de colônias.

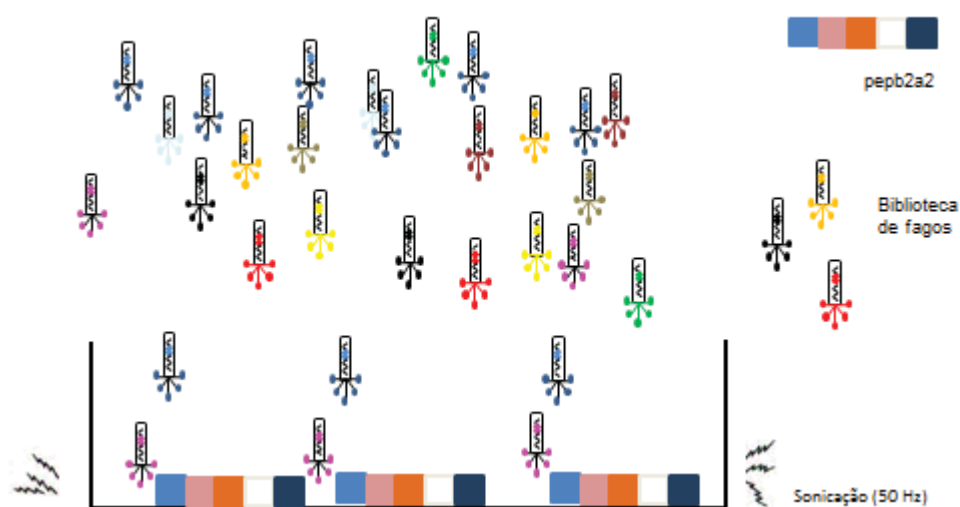


Figura 11 - ESQUEMA DA SELEÇÃO POR PHAGE DISPLAY. O peptídeo pepb2a2 foi imobilizado em microplaca na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ para reconhecimento do pool das bibliotecas de fagos no phage display. FONTE: A autora (dissertação de mestrado, 2014).

3.2.3 Screening dos clones por ELISA

Os clones obtidos nos phage display foram coletadas cada uma das colônias e cultivadas individualmente em microtubos contendo 250 μL de meio LB contendo 20 mg/mL de antibiótico tetraciclina, com exceção da bactéria K91 utilizada como controle negativo, as quais foram incubadas overnight a 37 °C a 250 rpm. As amostras foram submetidas à centrifugação e os sobrenadantes foram testados em monoplicatas por ELISA.

Em uma placa para ELISA foi imobilizado o pepb2a2, em cada uma das diferentes estratégias, em uma concentração de 10 µg/ mL em 10 mL de *coating* *buffer* (NaHCO₃ 100 mM pH 8,6) e a placa foi incubada *overnight* em geladeira. Entre cada etapa a placa foi lavada 4 vezes com solução de lavagem.

O bloqueio dos sítios livres foi realizado utilizando solução de caseína 2% em PBS durante 1 hora a 37 °C. Adicionaram-se os sobrenadantes obtidos e os *pools* de fagos final, em monoplicatas. Como controle negativo utilizou-se fago silvestre. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C.

Para verificar a interação alvo-fago foi adicionado o anticorpo anti-fago M13 conjugado à peroxidase, diluído 1:400 em tampão de incubação e incubou-se durante 1 hora a 37 °C. Os poços foram lavados por 6 vezes e a placa foi revelada com 100 µL de solução reveladora [2 mg de OPD em 10 mL de tampão citrato e 2 µL de H₂O₂] e incubada por 20 minutos protegida da luz. A interrupção da reação foi feita com 20 µL de solução *stop* (ácido sulfúrico 1:20) e realizada a leitura espectrofotométrica a 490 nm.

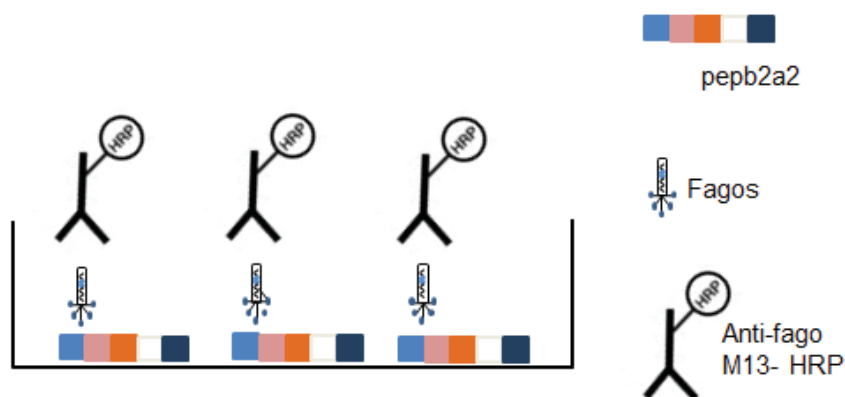


Figura 12 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DOS FAGOS. Amostras contendo 1 µg dos pepb2a foram imobilizadas em placas de 96 poços. Adicionaram-se os fagos, o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490nm. FONTE: A autora (dissertação de mestrado, 2014).

3.2.4 Avaliação da reatividade e especificidade dos clones por ELISA

Após o *screening* dos clones utilizando o sobrenadante, foram selecionados os fagos que apresentaram maior reatividade para testes posteriores de caracterização.

Um ensaio de ELISA foi realizado com o mesmo formato descrito anteriormente no item 3.2.3, utilizando 10 µg/mL de pepb2a2, pepb3a2 ou pepe1a2 imobilizados na microplaca e testados os clones previamente selecionados no *screening* em diferentes concentrações (10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/mL) e utilizou-se o fago silvestre como controle negativo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA.

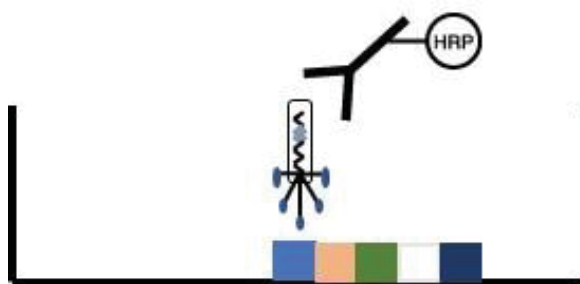


Figura 13 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DE REATIVIDADE. Amostras contendo 10 µg/mL dos pepb2a2, pepb3a3 e e1a2 foram imobilizadas em placas de 96 poços. Adicionaram-se os fagos, o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490 nm; FONTE: A autora (dissertação de mestrado, 2014).

3.2.5 Avaliação da capacidade de competição dos fagos com o anticorpo monoclonal pelo pepb2a2

A fim de se verificar a afinidade dos fagos pelo pepb2a2, um ensaio de ELISA de competição foi realizado utilizando o mesmo formato descrito

anteriormente no item 3.2.3, na qual incubaram-se os fagos em diferentes concentrações previamente ao anticorpo monoclonal anti-b2a2 1:150.000 (Cell Signling L99H4) em duplicatas e utilizou-se o fago silvestre como controle negativo.

Como anticorpo secundário, adicionou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase, diluído 1:4000 em tampão de incubação durante 1 hora a 37 °C. A análise do desvio padrão foi realizada com o programa Microsoft Excel.

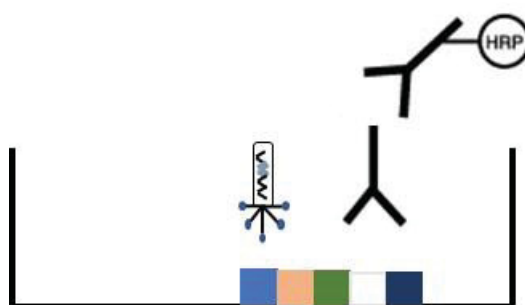


Figura 14 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DE COMPETIÇÃO. Amostras contendo 10 µg/mL do pepb2a2 foram imobilizadas em placas de 96 poços. Adicionaram-se os fagos em diferentes concentrações previamente, o anticorpo anti-b2a2 e o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com HRP (1:4000). A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490. FONTE: A autora (dissertação de mestrado, 2014).

3.3 PROCESSAMENTO DO DNA VIRAL E SEQUENCIAMENTO DO CLONE 13S

O clone selecionado, chamado de 13S, se mostrou bastante promissor nos ensaios de caracterização, desta forma, o DNA viral foi processado para obter a sequência nucleotídica que codifica o peptídeo apresentado por ele. Para tanto, o DNA foi extraído conforme protocolo descrito para kit Qiagen® 27704 – QIAprep spin M13 (Qiagen, Alemanha).

Bactérias infectadas com fagos individualizados foram cultivadas em 10 mL de meio LB, sob agitação constante a 250 rpm por 5 horas a 37 °C. Após centrifugação a 4°C e 2.630 g por 20 minutos, os sobrenadantes contendo fagos foram transferidos para microtubos esterilizados e centrifugados novamente nas mesmas condições, seguindo a partir desta etapa o protocolo do fabricante. A concentração final dos ácidos nucléicos foi dosada pelo espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Estados Unidos) e as amostras foram congeladas a -20° C.

A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Estados Unidos) com 100 ng de DNA amplificado, contendo 1 µL de tampão Big Dye e 0,5 µL de primer Zhong (Zhong et al., 1994) 10 pmol (5' AGT AGC AGA AGC CTG AAG A 3') ou Claude (Villard, Piquer, Raut, Le, & Granier, 2002), completando para 10 µL de reação em água DEPC. Foram utilizadas as seguintes condições de sequenciamento: 1 minuto a 96°C para desnaturação inicial do DNA, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e extensão final a 60°C por 4 minutos. Para precipitação e purificação adicionou-se 10 µL de água ultrapura, 2 µL de acetato de amônio (7,5 M) e 66 µL de etanol absoluto, que foram incubados por 10 minutos a -20°C. Os tubos foram centrifugados a 17.760 g por 25 minutos, o sobrenadante foi removido por inversão em papel absorvente. Foram adicionados 100 µL de etanol 70%, os quais foram centrifugados a 17.760 g por 5 minutos. O etanol foi removido e o tubo mantido em estufa a 37°C por 30 minutos para permitir a secagem. Todas as amostras testadas foram armazenadas a -20°C. A amostra foi submetida para sequenciamento no sequenciador automático Applied Biosystems 3130 (Thermo Scientific, Estados Unidos), no qual a sequência obtida foi analisada.

3.3.1 Análise do sequenciamento

As sequências nucleotídicas obtidas foram avaliadas quanto à presença de “CC TTC TGC AGC” antes do início do inserto e “GGC AAA” no final deste. A partir da sequência inserto realizou-se a análise de tradução utilizando o programa de tradução (Proteomics) disponível no endereço www.expasy.ch.

3.4 SÍNTESE DO PEPTÍDEO SOLÚVEL

Uma vez obtida e analisada a sequência referente ao peptídeo expresso pelo clone 13S, o peptídeo ligante de 17 aminoácidos, chamado de NMY, foi sintetizado pela empresa Aminotech (São Paulo, Brasil) com pureza $\geq 95\%$ contendo uma cisteína na porção N-terminal da molécula. A cisteína confere ao peptídeo a possibilidade de ser conjugada covalentemente via extensão C-terminal à diversas proteínas, como albumina sérica bovina ou ovalbumina (77120, Thermo Scientific, Estados Unidos), como descrito por Capelli-peixoto et al., 2011. Em síntese, a proteína carreadora, previamente diluída em PBS, foi ativada pelo crosslinker sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1- carboxilato) (22322B, Thermo Scientific, Estados Unidos). Após uma hora sob agitação constante em temperatura ambiente, apenas a proteína carreadora ligada ao *lin*□e□é recuperada através de coluna Pd-10 (GE Health Care, Inglaterra). A proteína ativada foi colocada sob reação por 2 horas com o peptídeo em temperatura ambiente, sob agitação constante e protegido da luz. O tampão contendo cisteína foi adicionado para bloquear os sítios livres e os peptídeos conjugados foram separados em alíquotas estocadas a -20°C .

3.4.1 Conjugação do ligante à diferentes moléculas

O NMY sintético foi conjugado às moléculas de biotina e FITC para marcação e detecção do nosso ligante. Inicialmente foi realizado o protocolo de acoplamento com biotina com a finalidade de marcar nosso ligante com uma molécula capaz de amplificar o sinal de detecção. Diante disso, a conjugação com biotina EZ-Link Sulfo-NHS-LC- Biotin (21335, Thermo Scientific, Estados Unidos) foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante com modificações, utilizando apenas 10% de excesso de biotina.

Ainda, o NMY foi conjugado a FITC, uma molécula fluorescente mais utilizada devido sua alta eficiência como fluoróforo e estabilidade do conjugado. Ainda, sua marcação é direta, isto é, não necessita da adição de nenhuma molécula secundária marcada para detecção. FITC reage com os grupos amino livres das proteínas para formar conjugados estáveis e possui absorção máxima a 525 nm. Para tanto, a conjugação com FITC (F7250, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante na proporção FITC/peptídeo de 0,06.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO LIGANTE NMY POR ELISA

3.5.1 Conjugação e caracterização dos peptídeos das fusões ao BSA

Os peptídeos representativos das fusões (pepb2a2, pepb3a2 e pepe1a2) foram conjugados à proteína carreadora BSA (*bovine serum albumin*) de acordo

com as orientações do fabricante Thermo Scientific com adaptações. Inicialmente, para a ativação do BSA utilizou-se a relação 2:1 de BSA:peptídeo, a partir do BSA na concentração 10 mg/mL em 4 mL de PBS. Dissolveram-se 2,4 mg de *synidylaleidoethylglyohexanoate* (SMCC) em 240 µL de dimetilformamida. As duas suspensões foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob leve agitação protegida da luz.

Para a separação do BSA ativado uma coluna PD10 foi preparada com lavagens com 200 mL de PBS e posteriormente com 50 mL de PBS-EDTA. Adicionou-se o BSA ativado, iniciando-se a eluição na coluna com a coleta das gotas em microtubos, sempre acrescentando PBS-EDTA a fim de evitar a secagem da coluna. A leitura de cada fração foi realizada em 280 nm na diluição 1:25 e realizada a plotagem dos valores no gráfico, utilizando o programa Microsoft Excel. A partir deste, identificou-se o 1º pico referente ao BSA-SMCC e incubou-se com 5 mg de cada peptídeo.

A solução de peptídeo foi preparada com concentração de 5 mg/mL. Adicionaram-se 5 mg dos peptídeos para 1 mL de BSA-SMCC e incubou-se por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação protegida da luz. Para o bloqueio das cisteínas livres foi utilizado uma solução de cisteína 5 mg/mL 1 mM e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente sob agitação protegida da luz. As amostras foram aliquotadas e congeladas.

As amostras conjugadas foram dosadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e foram devidamente caracterizadas visando comprovar a eficácia na conjugação, fundamental para garantir sua aplicabilidade em etapas posteriores. Para tanto, realizou-se uma eletroforese de proteínas, utilizando um gel de separação de acrilamida 10% (Laemmli, 1970) com 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) para migração das amostras conjugadas com BSA. Estas amostras foram diluídas 1:2 em tampão de amostra sob condições redutoras [tris-HCl 0,5 mol/L, pH6,8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v) e agente redutor β-mercaptoetanol 5% (v/v)] e fervidas por 5 minutos. Foram aplicados 5 µg de amostra nas canaletas e o gel foi submetido a uma diferença de potencial de 150 Volts em sistema BioRad na presença de tampão de corrida [tris 0,025 mol/L, glicina 0,2 mol/L e SDS 0,5%, pH 8,3).

Para coloração do gel foi utilizada solução de Coomassie R-250 [1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% ácido acético e 50% metanol] por 30 minutos para revelação e o excesso de corante foi removido com solução descorante [10% ácido acético].

3.5.2 Avaliação da reatividade e especificidade do ligante NMY

Realizou-se um ensaio de ELISA para verificar a reatividade do ligante sintético NMY frente ao pepb2a2 conforme formato já descrito no item 3.2.3, utilizando 0,3 µg/mL de pepb2a2 conjugado à BSA e diferentes concentrações do ligante biotilado com adição posterior de estreptavidina conjugada a peroxidase.

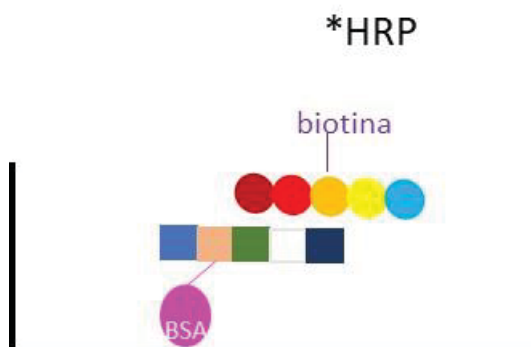


Figura 15 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DE REATIVIDADE NO NMY BIOTINILADO. Amostras contendo 0,3 µg/ mL do pep conjugados à BSA foram imobilizadas em placas de 96 poços. O ligante NMY conjugado com biotina foi adicionado em diferentes concentrações e a detecção foi realizada com o conjugado estreptavidina-HRP (1:10000). A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490 nm. FONTE: A autora (2018).

3.5.3 Avaliação da capacidade de competição do NMY pelo anticorpo monoclonal

A fim de se verificar a afinidade do ligante NMY pelo pepb2a2, um ensaio de ELISA de competição foi realizado conforme descrito no item 3.2.5, na qual diferentes concentrações do NMY foram incubados previamente ao anticorpo monoclonal anti-b2a2 1:150.000 (Cell Signling L99H4). O anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase foi utilizado na diluição de 1:4000 durante 1 hora a 37 °C para detecção do ensaio.

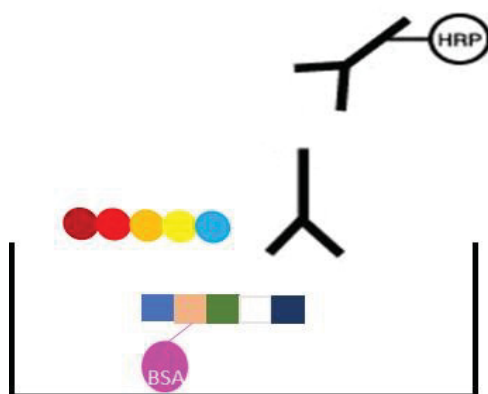


Figura 16 - ESQUEMA DO FORMATO DO ELISA DE COMPETIÇÃO. 0,3 µg/ mL do pepb2a2 conjugado à BSA foi imobilizado em placas de 96 poços. O ligante NMY foi adicionado em diferentes diluições previamente ao anticorpo anti-b2a2 (1:150.000). A reatividade foi detectada utilizando o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com HRP (1:4000). A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490nm. FONTE: A autora (2018).

3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES DO LIGANTE PEPTÍDICO POR

□□□□ E □□□□□□ □□□□□□□

A técnica de spot synthesis (Frank, 2002) baseia-se na síntese de peptídeos paralelos sobre membrana de celulose e é realizada uma substituição pontual em um resíduo da sequência por um aminoácido de caráter neutro, seja ela alanina ou glicina quando ocorre a presença deste aminoácido na sequência.

3.6.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS SOBRE MEMBRANA DE CELULOSE

Foram sintetizados spots em uma membrana de celulose contendo grupamentos hidroxila conjugados ao espaçador polietilenoglicol (PEG) ligado a fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) utilizando um sintetizador automático Intavis Bioanalytical Instruments (Köln, Alemanha). Os spots controles correspondem as sequências aminoacídicas correspondente de cada fusão, contendo 13 aminoácidos. Em cada spot seguinte houve a substituição pontual de cada resíduo por um aminoácido neutro- a alanina ou por glicina quando houvesse a presença desta na sequência. Ainda, foram sintetizados spots correspondentes a sequência normal de ABL1 e BCR. A síntese da membrana de spot foi realizada pelo professor Dr. Ricardo Machado-de-Ávila da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma-SC (quadro 1).

pepb2a2	I-P-L-T-I-N-K-E-E-A-L-Q-R
	A-P-L-T-I-N-K-E-E-A-L-Q-R
	I-A-L-T-I-N-K-E-E-A-L-Q-R

	I-P-A-T-I-N-K-E-E-A-L-Q-R
	I-P-L-A-I-N-K-E-E-A-L-Q-R
	I-P-L-T-A-N-K-E-E-A-L-Q-R
	I-P-L-T-I-A-K-E-E-A-L-Q-R
	I-P-L-T-I-N-A-E-E-A-L-Q-R
	I-P-L-T-I-N-K-A-E-A-L-Q-R
	I-P-L-T-I-N-K-E-A-A-L-Q-R
	I-P-L-T-I-N-K-E-E-G-L-Q-R
	I-P-L-T-I-N-K-E-E-A-A-Q-R
	I-P-L-T-I-N-K-E-E-A-L-A-R
	I-P-L-T-I-N-K-E-E-A-L-Q-A
pepb3a2	G-F-K-Q-S-S-K-A-L-Q-R-P
	A-F-K-Q-S-S-K-A-L-Q-R-P
	G-A-K-Q-S-S-K-A-L-Q-R-P
	G-F-A-Q-S-S-K-A-L-Q-R-P
	G-F-K-A-S-S-K-A-L-Q-R-P
	G-F-K-Q-A-S-K-A-L-Q-R-P
	G-F-K-Q-S-A-K-A-L-Q-R-P
	G-F-K-Q-S-S-A-A-L-Q-R-P
	G-F-K-Q-S-S-K-G-L-Q-R-P
	G-F-K-Q-S-S-K-A-A-Q-R-P
	G-F-K-Q-S-S-K-A-L-A-R-P
	G-F-K-Q-S-S-K-A-L-Q-A-P
	G-F-K-Q-S-S-K-A-L-Q-R-A
pepe1a2	G-A-F-H-G-D-A-E-A-L-Q-R-P
	A-A-F-H-G-D-A-E-A-L-Q-R-P
	G-G-F-H-G-D-A-E-A-L-Q-R-P
	G-A-A-H-G-D-A-E-A-L-Q-R-P
	G-A-F-A-G-D-A-E-A-L-Q-R-P
	G-A-F-H-A-D-A-E-A-L-Q-R-P
	G-A-F-H-G-A-A-E-A-L-Q-R-P
	G-A-F-H-G-D-G-E-A-L-Q-R-P
	G-A-F-H-G-D-A-A-A-L-Q-R-P
	G-A-F-H-G-D-A-E-G-L-Q-R-P
	G-A-F-H-G-D-A-E-A-A-Q-R-P
	G-A-F-H-G-D-A-E-A-L-A-R-P
	G-A-F-H-G-D-A-E-A-L-Q-A-P
	G-A-F-H-G-D-A-E-A-L-Q-R-A
	spa□e

pepBCR	V-H-S-I-P-L-T-I-N-K-E-D-D
pepBCR	V-H-S-I-P-L-T-I-N-K-E-D-D
PepABL1	S-C-Y-L-E-E-A-L-Q-R-P-V-A
PepABL1	S-C-Y-L-E-E-A-L-Q-R-P-V-A

Quadro 1 – DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS SINTETIZADAS EM CADA SPOT DA MEMBRANA.

3.6.2 Reatividade do NMY-FITC frente aos peptídeos sintéticos lineares

Inicialmente a membrana foi ativada com metanol absoluto por 5 minutos e então foi lavada três vezes com tampão TBS (KCl 0,002 mol/l, Tris 0,05 mol/l em salina, pH 7.4) e incubada sob agitação *overnight* com solução de bloqueio 3% BSA em TBS-Tween 20 0,05% (TBS-T). Após bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T 0,05% e incubada com 200 ng/mL de NMY-FITC a 37 °C sob agitação *overnight*. Um peptídeo irrelevante conjugado à FITC (pep IR-FITC) foi testado como controle negativo sob as mesmas condições. A reação foi detectada e analisada no Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Estados Unidos). Posteriormente as proteínas presentes nos *spots* foram confirmadas utilizando Ponceau 0,2% e 10% de ácido acético.

Após cada ensaio é necessário realizar a regeneração da membrana de *spot*. Inicialmente, a membrana é lavada durante 10 minutos, três vezes, com uma solução denominada de reagente A (uréia 8 mol/L, SDS 1% (p/v) e β -mercaptoetanol 0,1% (v/v)). Posteriormente, a membrana é incubada com reagente B (etanol/água/ácido acético 5:4:1) por 10 minutos, três vezes e, subsequentemente, lavada com metanol. Após secagem a frio, a membrana está pronta para ser bloqueada novamente ou ser armazenada a -20 °C.

3.7 ANÁLISE DOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS E DA CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL DAS FUSÕES

Para fins de análise e caracterização das interações, foram realizados os alinhamentos dos aminoácidos correspondentes das fusões (pepb2a2, pepb3a2 e pepe1a2) utilizando o programa Clustal O 1.2.4 multiple sequence alignment. Ainda, a predição dos modelos das estruturas conformacionais das fusões foram geradas utilizando a plataforma online I-TASSER e o programa de bioinformática Chimeric 1.13.1rc.

3.8 ENSAIO PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE b2a2^{BCR-ABL1} UTILIZANDO UM MODELO CELULAR

Para verificar se o ligante NMY seria capaz de detectar a proteína b2a2^{BCR-ABL1} foi realizado um ensaio *in vitro*. Células HEK 293 T foram transfectadas com o plasmídeo correspondente a fusão b2a2 para expressão da proteína intracelular. Entretanto, para que esse teste fosse possível, o plasmídeo P210 pcDNA3 (desenvolvido por Warren Pear (He et al., 2002) contendo o transcrito b3a2 foi adquirido comercialmente (#27481, Addgene, Estados Unidos) e deste, 75 pares de bases foram removidos de forma a se obter a proteína b2a2^{BCR-ABL1}. As estratégias de biologia molecular para a obtenção do plasmídeo contendo b2a2^{BCR-ABL1} serão descritas a seguir.

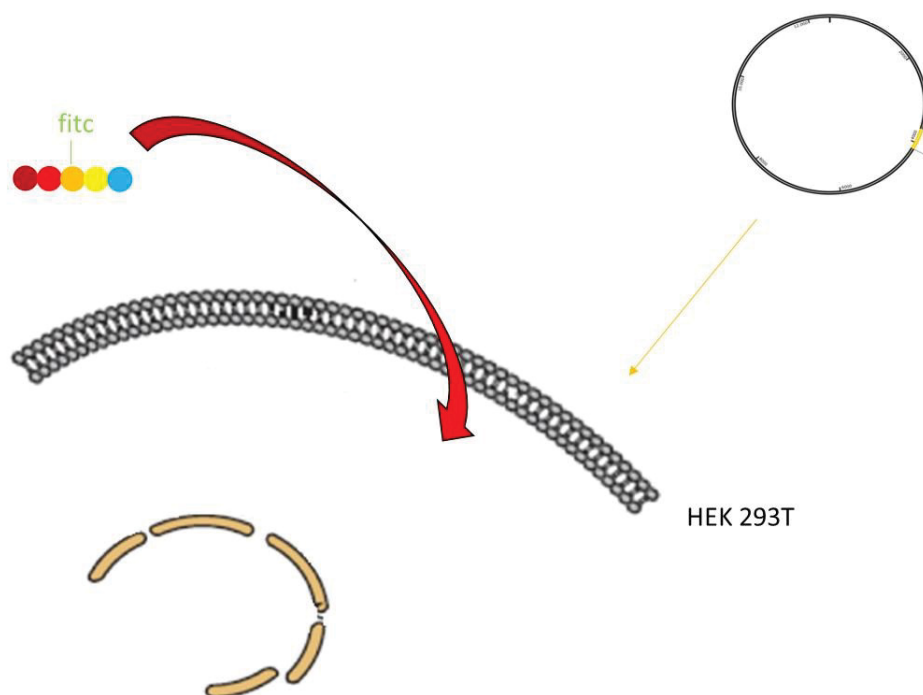


Figura 17 - ESQUEMA DA DETECÇÃO DA PROTEÍNA BCR-ABL1 PELO NMY-FITC EM MODELO CELULAR. HEK 293 T transfectadas com o plasmídeo Pb2a2 foram permeabilizadas e adicionado o NMY-FITC para detecção da proteína BCR-ABL1 citoplasmática FONTE: A autora (2018).

3.8.1 CONSTRUÇÃO DE UM VETOR CODIFICANTE PARA b2a2 BCR-ABL1-Pb2a2

Foi necessária a construção de um plasmídeo referente à fusão b2a2 para realização do ensaio de detecção da proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1}, uma vez que este não se encontra disponível comercialmente. Para este fim, utilizamos um vetor construído com a fusão b3a2 como molde.

A partir da análise deste plasmídeo, verificou-se a presença de 75 pares de bases que flanqueiam as regiões de interesse para obter a sequência codificante IPLTINKEEALQR, correspondente à fusão b2a2.

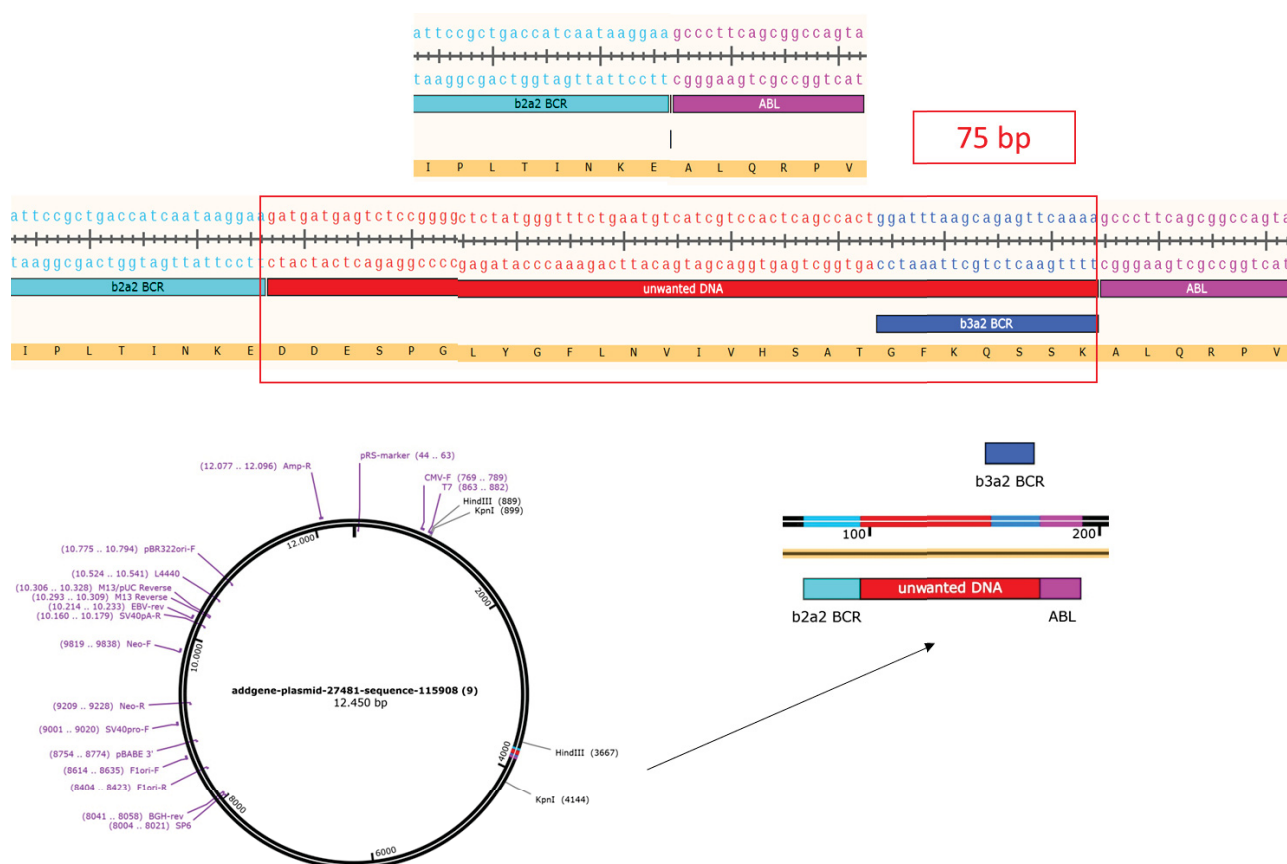


Figura 18 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MAPA E SEQUÊNCIAS DO VETOR P210 pcDNA3. Barra abaixo da sequência nucleotídica: azul claro- região de quebra b2 em BCR, azul escuro- região de quebra b3 em BCR, rosa- região da quebra em a2 em ABL1, vermelho- região a ser deletada. FONTE: A autora (2018).

Para a deleção da região foram realizadas diferentes estratégias baseadas na metodologia de deleção de DNA plasmidial por PCR (Hansson, Rzeznicka, Rosenba, Hansson, & Sirijovski, 2008). Esta baseia-se na amplificação de um vetor deletando-se uma região a partir da utilização de um par de *primers* complementares.

Para proceder com a deleção da região de 75 pb a partir da PCR foram desenhados um par de *primers* de 38 bp. O *primer* *forward*, chamado de 3, foi concebido como o complemento inverso de uma sequência correspondente a 19 pb a que antecede a região do DNA a ser eliminado e seguido de 19 pb igual à sequência posterior (5'-

TGACCATCAATAAGGAAGAAGCCCTTCAGCGGCCAGTA-3'). O *primer 4*, chamado de 4, foi projetado da mesma forma, mas corresponde à fita complementar, isto é, a sequência do primer é idêntica à sequência primária do plasmídeo (5'-TACTGGCCGCTGAAGGGCTTCTTCCTTATTGATGGTCA-3'.

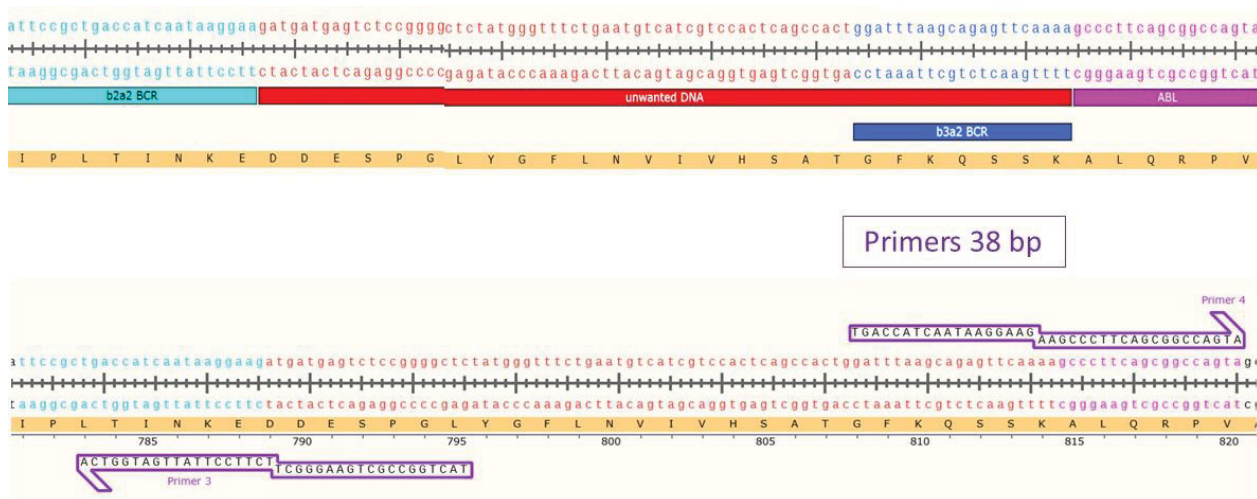


Figura 19 - ALINHAMENTO DOS PRIMERS NAS SEQUÊNCIAS DE INTERESSE DO GENES. Os nucleotídeos a serem deletados estão flaqueados pelos *primers*. FONTE: A autora (2018).

Ainda, foi necessária a construção de dois primers de 20 pb (*primer 1* e *primer 2*), chamdo de 1, 5'- GCAAGGCTACGGAGAGGCTG-3' e *primer 2*, 5'- ACTGGGTCCAGCGAGAAGGT-3') entre a região a ser deletada para posterior amplificação e sequenciamento.

3.8.2 Primeira estratégia de deleção utilizando-se primers de 38 pares de bases

Primeiramente, o plasmídeo P210 pcDNA3 adquirido comercialmente e enviado pela empresa foi clonado em *Escherichia coli* DH5 α , a qual foi isolada em placa LB ágar com ampicilina e *kanamycin* a 37 °C. Assim, a partir de uma colônia isolada foi realizado um pré-inóculo com 10 mL de meio líquido LB a 37°C e 250 rpm *kanamycin* para realização da extração do DNA plasmidial (*miniprep*), o qual foi purificado utilizando-se o kit MSB® Spin PCRapace (Stratagene, Berlin, Germany) nas condições descritas pelo fabricante, dosado em espectrofotômetro *Nanodrop* 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) e armazenado a -20 °C.

A estratégia para a deleção dos 75 pb do vetor da região sem interesse no vetor b2a2^{BCR-ABL1} foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Hanson et al., 2008, com modificações. Resumidamente, foi adicionado 0,2 μ M de cada um dos *primers* 3 e 4, 50 ng de DNA, 0,2 mM de cada base de dNTP para volume final de 50 μ l de reação. Diferentes polimerases foram testadas, dentre elas *Quanta* (Thermo Scientific, Estados Unidos), *Phusion* (Nørholm, 2010) e Phusion High fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Estados Unidos). As condições da reação de amplificação foram: 5 minutos a 95 °C para desnaturação inicial do DNA, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos, com extensão final a 72 °C por 7 minutos. Após a PCR foi realizada a digestão com 2 U *Pst*I (Fermentas, Estados Unidos) com adição de MgSO₄ para concentração final de 10 mM por 2 horas a 37 °C para degradar o plasmídeo molde.

3.8.3 Segunda estratégia de deleção por clonagem da região a ser deletada em vetor menor PBlueScript (PBS)

Tendo em vista que a grande extensão do vetor P210 pcDNA3 (12,450 pb), outra estratégia utilizada foi a clonagem da região a ser deletada em um vetor menor. Uma vez que a região em questão estava flanqueada pelas enzimas de restrição *Pst*I e *Not*I foi escolhido o vetor pBlueScript (Bartholomeu et al., 2003) para clonagem por conter estes dois sítios de restrição.

Os dois plasmídeos foram submetidos a cortes enzimáticos com *Pst*I e *Not*I. Os cortes não foram realizados com as duas enzimas ao mesmo tempo devido às incompatibilidades entre os tampões e às especificações/ restrições de cada uma. Primeiramente, foi realizado o corte com a enzima *Pst*I (Fermentas, Estados Unidos) com seu tampão específico *Pst*NI por 2 horas a 37 °C e posterior 5 minutos a 56 °C para inativação da enzima.

O produto da reação foi submetido à precipitação overnight a -20 °C com 2 µL de acetato de sódio, 125 µL de etanol absoluto gelado e 1 µL de glicogênio. No dia seguinte o microtubo foi submetido a centrifugação a 17.760 g por 25 minutos, sendo o conteúdo removido por inversão em papel absorvente. Para purificação, foram adicionados 100 µL de etanol 70%, a solução foi centrifugada a 17.760 g por 5 minutos. O etanol foi removido e o tubo mantido em estufa a 37°C por 30 minutos para permitir a secagem. Posteriormente, foi adicionada a enzima *Not*I (Fermentas, Estados Unidos) em *Not*BI para corte por 2 horas a 37 °C e posterior inativação da enzima.

Os produtos da digestão enzimática de ambos plasmídeos foram separados em gel de agarose 2% e o fragmento de interesse flanqueado por *Pst*I e *Not*I do vetor P210 pcDNA3 foi cortado do gel e purificado utilizando o GE Health Care illustra™ GFX™ PCR DNA and gel band purification kit (GE Health Care, Inglaterra) de acordo com as recomendações do fabricante. O mesmo foi realizado para obtenção do vetor pBlueScript. Uma vez purificados, foi realizada a ligação do inserto do P210 pcDNA3 no vetor pBlueScript utilizando 1 µL da

enzima *DNA* ligase (Promega, Brasil) o *overnight* a 16 °C. No dia seguinte, incubou-se a reação 1 hora a 72 °C para inativação da enzima.

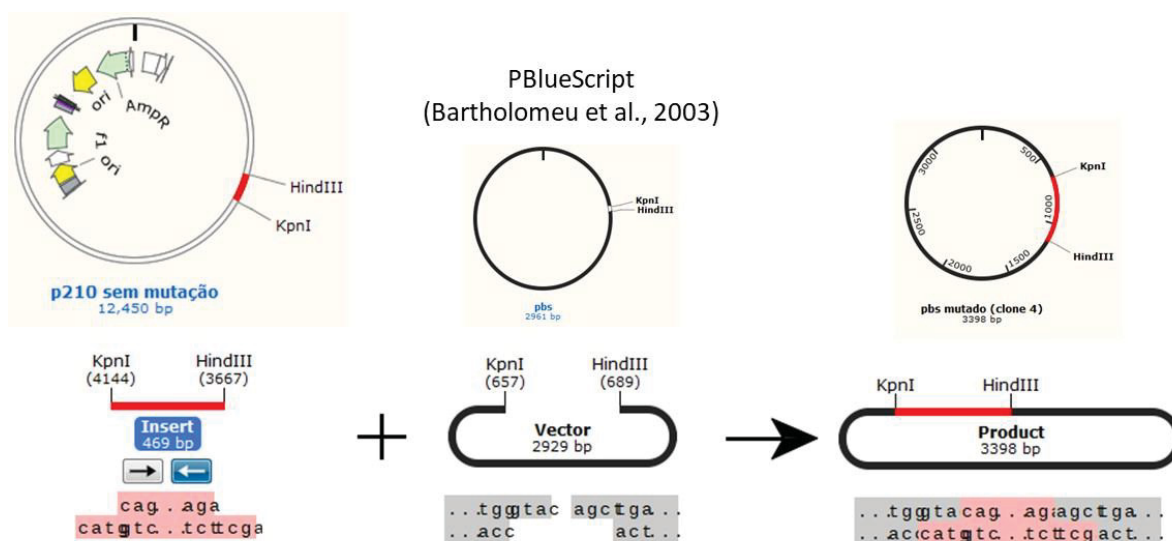


Figura 20 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA OBTENÇÃO DO VETOR PBlueScript CONTENDO A REGIÃO DE INTERESSE DA JUNÇÃO BCR COM ABL1 PROVENIENTE DO VETOR P210 pcDNA3. O vetor resultante foi submetido à PCR de deleção. FONTE: A autora (2018).

O produto resultante desta clonagem foi utilizado como DNA molde para realização da PCR de deleção utilizando as condições detalhadas no item 3.8.1 com *primers* *poly* e *ase*. O produto da PCR foi submetido à digestão por 1 hora com *p* e transformado em *coli* DH10B quimiocompetentes.

Para preparação das bactérias, 50 mL de cultura em meio LB (pH 7,0 (1% (w/v) peptona, 0,5% (w/v) extrato de levedura e NaCl 0,170 M) em fase exponencial (densidade óptica A600 nm 0,4-0,7) foram centrifugados a 5.000 g

por 10 minutos a 4 °C e ao *pellet* foram adicionados 25 mL de cloreto de cálcio (CaCl₂ 0,1 M). As bactérias foram mantidas à temperatura de 4 °C por 1 hora e, após nova centrifugação a 5.000 g por 10 minutos a 4 °C com a adição de 2 mL de CaCl₂.

Para a transformação, um volume de 100 µL de bactérias competentes adicionado de 150 ng do vetor molde foi mantido a 4°C durante 30 minutos. Para transformação propriamente dita, as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42° C por 1 minuto e 5 minutos a 4° C. Posteriormente, foram adicionados 400 µL de meio S.O.C. (2% triptona, 0.5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM de glucose) . As bactérias foram mantidas a 37°C por 45 minutos sob agitação de 150 rpm antes da semeadura em meio LB ágar, com ampicilina e incubadas a 37°C *overnight*. As colônias isoladas transformadas, foram selecionadas e colocadas em meio LB líquido para o crescimento da cultura e posterior extração de DNA plasmidial (*miniprep*) e purificadas utilizando-se o kit MSB® Spin PCRapace (Strattec, Alemanha) nas condições descritas pelo fabricante e dosados em espectrofotômetro *nanodrop* 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Para confirmar a deleção do plasmídeo, o vetor purificado foi submetido a digestão enzimática com as enzimas de restrição *pne* e *ind*. As bandas foram verificadas por separação em gel de agarose 1% corado com corante Safer K9-16C (Kasvi, Brasil). O plasmídeo foi submetido à análise de sequenciamento de acordo com o protocolo já descrito no item 3.3, utilizando os *primers* *ni* e *sal* e *ee*.

3.8.3 Terceira estratégia de deleção por utilização de um megaprimer (394 pb)

Ainda, outra abordagem para deleção dos 75 pb do vetor P210 pcDNA3 (12,450 pb) empregou um *megaprimer* tendo em vista que é um método que

requer apenas uma etapa e há menor chances de mutações em outros sítios do plasmídeo.

A partir do vetor pBlueScript com deleção da região obtido na estratégia anterior (3.8.2) foi realizada a amplificação da região deletada utilizando os primers *prim3* e *prim4* e as enzimas constituintes do vetor *pT7* e *pT7*.

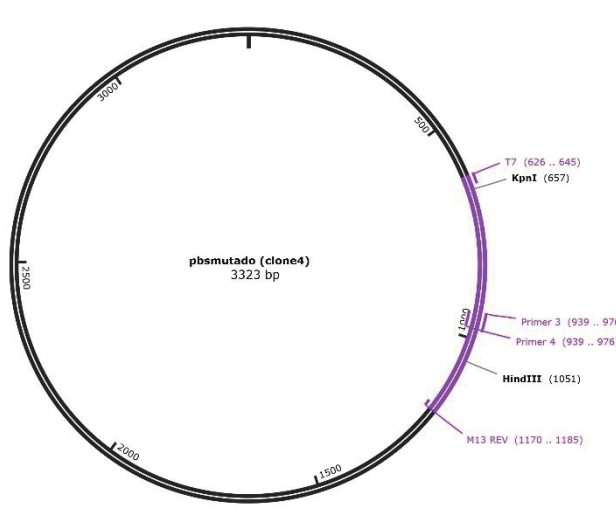


Figura 21 - VETOR PBlueScript MUTADO. Esquema representativo da mapa do vetorPBlue Script contendo a região de interesse deletada. Em roxo estão apresentados os primers e em preto as enzimas de restrição.

Para obtermos uma sequência homóloga à encontrada no P210 pcDNA3 foi necessário o corte enzimático com *pnl* e *ind*, realizada como descrito anteriormente no item 3.8.2. Este fragmento resultante (394 pb) foi utilizado como *template* da PCR de deleção do vetor P210 pcDNA3 utilizando o protocolo descrito no item 3.8.1 com *high fidelity* *pol*ase (New Englands Biolabs).

As condições da reação de amplificação foram: 5 minutos a 95 °C para desnaturação inicial do DNA, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento e extensão a 72 °C por 6 minutos, com extensão final a 72 °C por 5 minutos. Após a PCR foi realizada a digestão com 2 U *pnl* (Fermentas,

Estados Unidos) com adição de MgSO_4 para concentração final de 10 mM por 2 horas a 37 °C para degradar o plasmídeo molde.

3.8.4 Obtenção vetor Pb2a2 utilizando-se um vetor intermediário

Diante do fato de já possuímos o vetor *pVegIPT* com a região deletada, realizamos uma estratégia para clonar o fragmento deletado no vetor original. Entretanto, a clonagem do fragmento deletado no vetor P210 pcDNA3 não é possível de ser realizada em uma única etapa pois este vetor possui sítios múltiplos de restrição para as enzimas *Pst* e *Not*. Para isto, realizamos uma etapa adicional utilizando um vetor intermediário pROCKGFPNeo (Darocha et al., 2004).

Previamente, foram realizadas digestões dos vetores P210 pcDNA3 e pROCKGFPNeo com as enzimas *Not* (Thermo Scientific, Estados Unidos) e *he* (New England Biolabs, Estados Unidos), resultando em um plasmídeo intermediário (pROCKGFPNeo) contendo sítios únicos de *Pst* e *Not*. Desta forma, foi realizada a etapa de clonagem do fragmento deletado do pBlueScript para o pROCKGFPNeo e recloneado com *Not* e *he* para o vetor original p210 pcDNA3. A confirmação da obtenção do vetor Pb2a2 foi realizada após análise do sequenciamento realizado de acordo com o item 3.3 com os primers *oad* e *ee* e *se*.

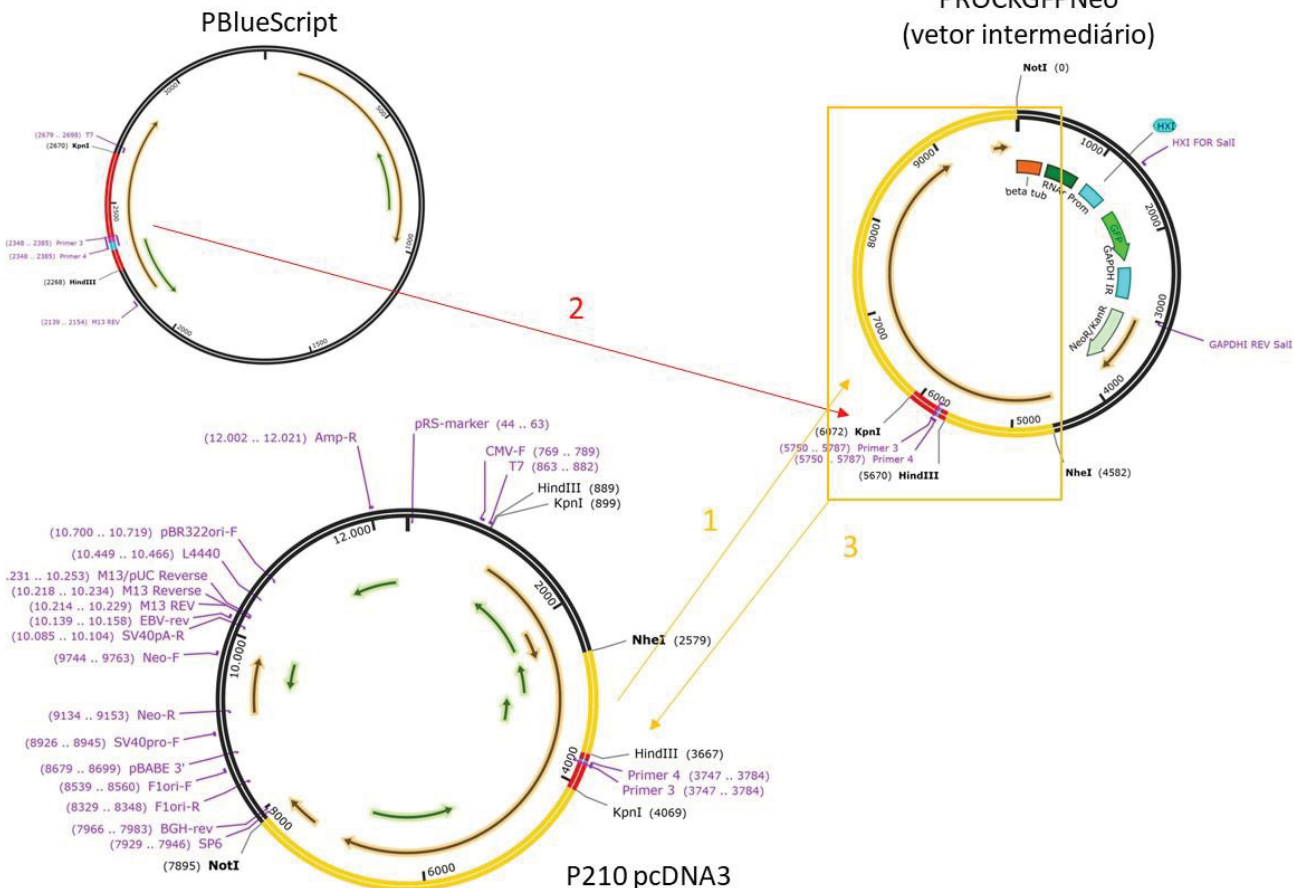









Figura 22 - OBTENÇÃO DO VETOR Pb2a2. Esquema representativo da obtenção do vetor Pb2a2 a partir da clonagem em um vetor intermediário (PROCKGFPNeo). Seta 1- Indica a etapa de clonagem do inserto flanqueado por  e  do vetor P210 pcDNA3 para o PROCKGFPNeo; Seta 2- Indica a etapa de clonagem da região deletada flanqueada por  e ; Seta 3- Indica a etapa de reclonagem do inserto com a região deletada flanqueada por  e  para o vetor P210 pcDNA3. FONTE: A autora (2018).

3.8.5 Cultivo celular da linhagem HEK 293 T

O cultivo da linhagem celular HEK 293T de rim de embrião humano (do inglês, [Human Embryonic Kidney 293T cells](#)) (293tsA1609neo - ICLC HTL04001) foi realizado em garrafas de cultivo de 25 cm³ contendo 10 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, (Sigma-Aldrich, Estados Unidos),

suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e L-glutamina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) em estufa de cultivo celular com atmosfera de CO₂ a 37 °C.

A subcultura celular foi realizada a cada 2 dias a partir da remoção e descarte do meio de cultura, lavado com solução PBS para remoção dos traços de SFB por completo e adição de 300 µL de tripsina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) por 5 minutos a 37 °C ou até visualização do desprendimento das células. As células foram aspiradas e centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o  foi gentilmente recuperado em meio de cultura e passado para garrafa de cultivo.

3.8.6 Transfecção de células HEK 293 T com P210 pcDNA3 (b3a2) e Pb2a2 (b2a2)

A transfecção transiente em células HEK foi realizada com plasmídeos que expressam b3a2 (P210 pc DNA3), b2a2 (Pb2a2) BCR-ABL1 e um plasmídeo GFP como controle (pEGF) utilizando Fosfato de Cálcio (CaPO₄) ou Lipofectamina 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isto, 1 x 10⁵ células da linhagem HEK 293 T previamente cultivadas foram plaqueadas em placa de Petri para cultivo celular 34 mm (TPP, Suíça) no dia anterior a transfecção para obtenção de ~70% de confluência.

Para a estratégia de transfecção com Fosfato de Cálcio foram utilizados 125 µL de água MiliQ, 3 µg de plasmídeo, 41,7 µL de CaCl₂ 1M, 333,4 µL de BBS 1x (BES 500 mM, NaCl 2,8 M, Na₂HPO₄ 15 mM) e qsp 2 mL de meio MEM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) mantendo a solução em repouso por 5 minutos. Já para a estratégia com Lipofectamina 2000, foram adicionados 250 µL de meio Opti-MEM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) sem SFB e antibiótico em

microtubos de 1,5 mL. Em cada microtubo foram adicionados 3 µg ou 6 µg de cada plasmídeo e 6 µL de lipofectamina na superfície do menisco e a solução deixada em repouso por 20 minutos. Após este período, a solução contendo lipofectamina foi misturada à solução de plasmídeo a qual foi deixada em repouso por 20 minutos. Adicionou-se o conteúdo do microtubo às culturas celulares que foram mantidas em estufa com atmosfera de CO₂ a 37 °C. Após 5 horas da transfecção, o meio celular foi trocado e as células mantidas em cultura por 24 horas.

3.8.7 Ensaio de imunofluorescência

3.8.7.1 Marcação da BCR-ABL1 citoplasmática de células em monocamadas (2D) para reação de fluorescência

Em torno de 3×10^4 células foram cultivadas em lamínulas de vidro previamente preparadas para proceder a reação de fluorescência. As células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 2% diluído em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. O excesso do fixador foi removido após lavagem com PBS e realizado o bloqueio dos radicais aldeídicos livres com 0,1 M de glicina por 5 minutos. A permeabilização das células foi realizada junto à etapa de bloqueio com 0,01% de saponina e 1% de BSA em PBS por 20 minutos. Para a marcação da proteína b2a2 BCR-ABL1 foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-b2a2 (Cell Signaling L99H4) 1:100 diluído na solução de permeabilização/ bloqueio por 2 horas a temperatura ambiente. Foi utilizado um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com Alexa Fluor 488 produzido em goat, diluído 1:250 em PBS 0,01% saponina por 40 minutos.

Para a incubação do NMY-FITC foram utilizadas as concentrações de 25 e 50 μ M do ligante NMY conjugado com FITC diluído na solução de permeabilização/bloqueio por 15 minutos a temperatura ambiente.

3.8.7.2 Montagem lâminas

Para preparo das lâminas foram adicionados 8 μ L de fluomount G nas lâminas previamente limpas. As lamínulas foram cuidadosamente removidas dos poços onde foram realizadas as reações, rapidamente passadas em água ultrapura e vertidas sobre o fluomount G contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para realização da marcação nuclear. As lâminas foram seladas com esmalte incolor após 2 horas e armazenadas sob abrigo de luz até serem submetidas à análise.

3.8.7.3 Análise microscopia confocal

As lâminas previamente preparadas foram analisadas em microscópio de confocal (Olympus, Tokyo, Japão) no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência da UFPR com os filtros de excitação apropriados para visualização de FITC. As imagens e análises foram realizadas utilizando os programas Fiji (ImageJ) e Microsoft Office Excel.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As proteínas BCR-ABL1 geradas a partir do transcrito b2a2 possuem 927 aminoácidos referentes ao gene BCR fusionadas a 1096 aminoácidos do ABL . A segunda forma derivada de b3a2 é resultante da fusão de 902 aminoácidos do BCR com a mesma sequência de ABL . A outra forma, geralmente encontrada em pacientes com LLA e codificada por e1a2, possui 426 aminoácidos referentes a BCR fusionada com o éxon a2 do ABL (Deininger et al., 2000).

Baseando-se nas sequências destas proteínas disponíveis no banco de dados Genbank, três peptídeos correspondentes à região de junção BCR-ABL foram desenhados pelo Dr. Roberto Rosati do Instituto Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba-PR.

Foram sintetizados peptídeos correspondentes a cada uma dessas junções conforme mostrado na figura 23, constituídos de 14 aminoácidos, e incorporou-se uma cisteína na região N-terminal a fim de permitir a conjugação à outras moléculas posteriormente.

peptídeo. Verificou-se que o fago 13S e 25S se destacaram em relação aos demais, sendo suas reatividades dose-dependentes. Estes apresentaram reatividades similares à do anticorpo monoclonal na concentração de 10^{10} TU/mL, sendo duas vezes maior quando comparadas aos demais clones testados (figura 24), sendo a reatividade apresentada pelo clone 13S ser significativa. Já o clone 25S não apresenta uma reatividade significativa, mas possui uma tendência a ser ($p = 0,1371$). Pode-se inferir que as reatividades apresentadas pelos clones são referentes aos seus peptídeos expressos e não frente ao fago em si, uma vez que o fago silvestre apresentou uma reatividade praticamente nula.

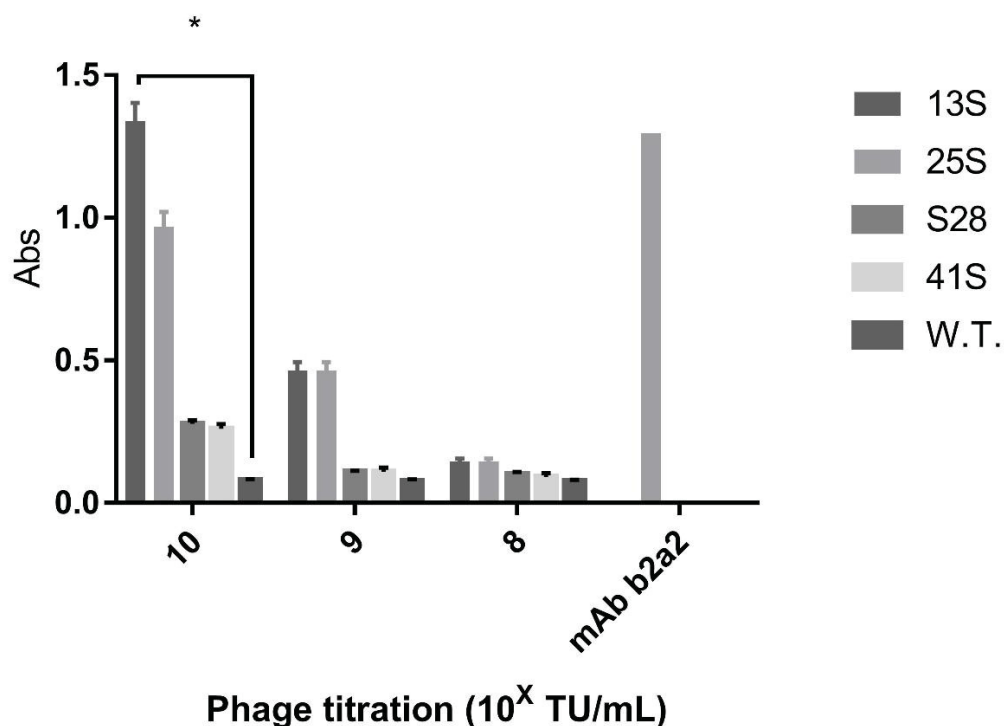


Figura 24 - REATIVIDADE DOS FAGOS, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, FRENTE AO pepb2a2. Os fagos selecionados e o fago silvestre, wild type (WT) foram adicionados nas concentrações de 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/mL e utilizou-se o anticorpo anti-b2a2 como controle positivo frente ao peptídeo b2a2. Adicionou-se o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490 nm.

4.2.1 ENSAIO DE ESPECIFICIDADE

Os fagos 13S e 25S mostraram-se bastante promissores e foi avaliada a especificidade dos mesmos frente aos outros dois peptídeos sintéticos correspondentes aos transcritos pepb3a2 e pepe1a2. Ambos peptídeos apresentaram baixa reatividade mesmo em maiores concentrações (10^{10} TU/mL) frente aos pepb3a2 e ao pepe1a2, respectivamente (figuras 25 e 26).

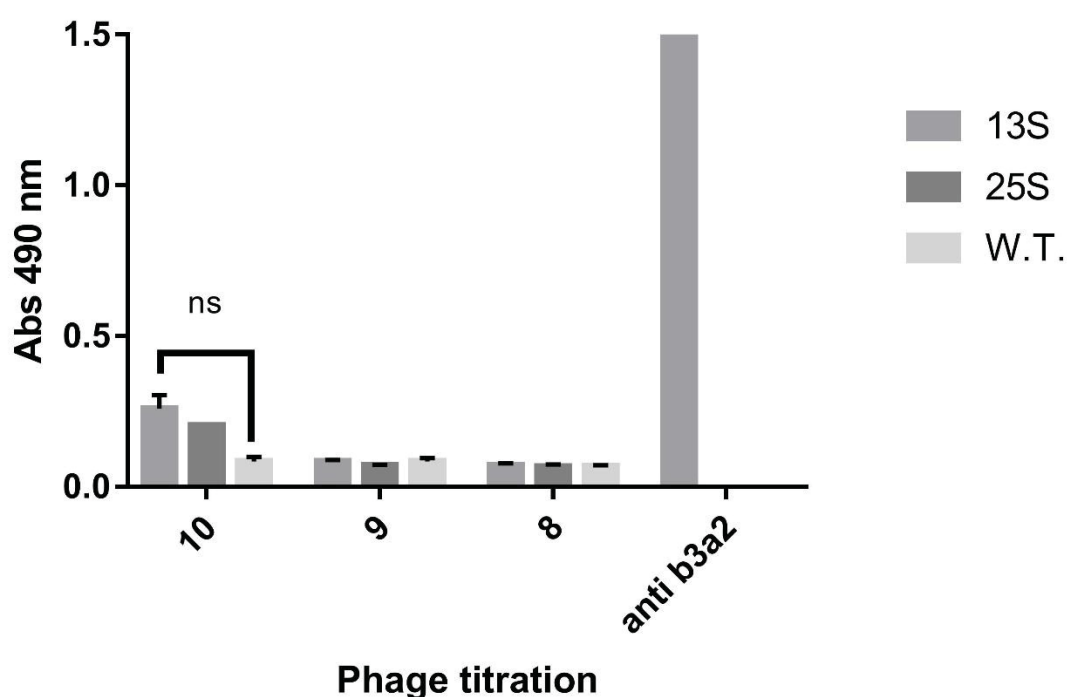


Figura 25 - ESPECIFICIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AO pepb3a2. O peptídeo pepb3a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Adicionaram-se os fagos nas concentrações de 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/mL e o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490 nm.

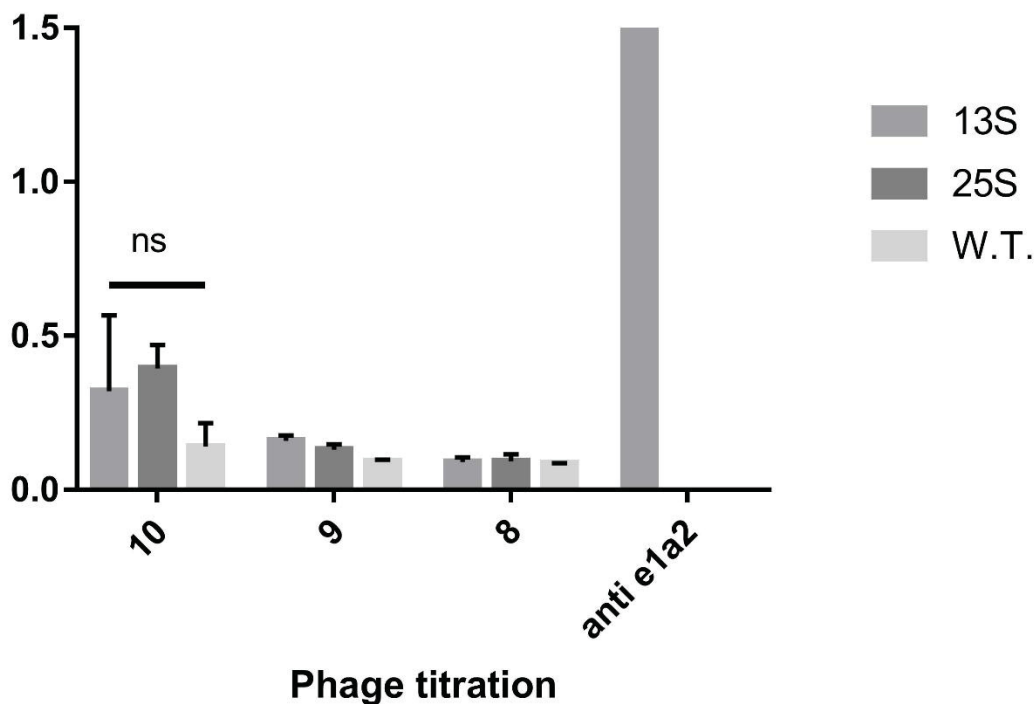


Figura 26 - ESPECIFICIDADE DOS FAGOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AO pepe1a2. O peptídeo pepe1a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Adicionaram-se os fagos nas concentrações de 10^{10} , 10^9 e 10^8 TU/mL e o conjugado anti-M13 (1:400) marcado com peroxidase e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490 nm.

4.2.2 ENSAIO DE COMPETIÇÃO

Foi realizado um ensaio de ELISA para verificar se os clones 13S e 25S seriam capazes de inibir a ligação entre o pepb2a2 imobilizado na placa e o anticorpo monoclonal anti-b2a2 (1:150 000). O fago □ □ □ □ □ □ □ □ foi utilizado como controle negativo. Ambos os clones foram capazes de inibir a reatividade do anticorpo monoclonal, a partir da diminuição da absorbância (linha). Percebe-se que a ligação do anticorpo diminuiu em 38,12% e 27,15% (barras), respectivamente. Não havendo interferência do fago □ □ □ □ □ □ □ □ (figura 27). O fago 13S apresentou melhor capacidade de inibição e foi escolhido para proceder com os próximos experimentos devido sua capacidade.

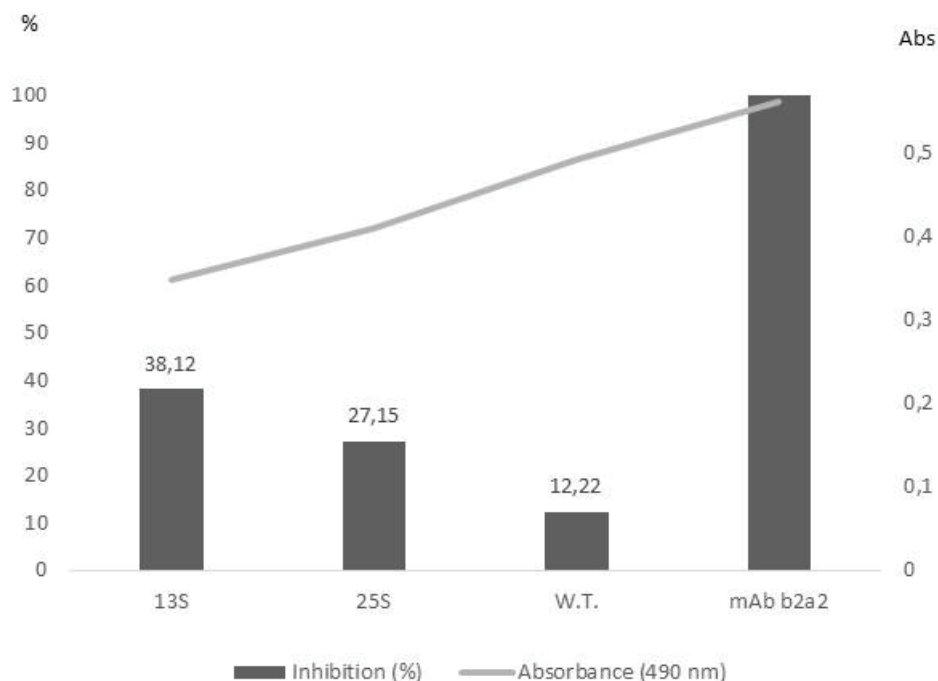


Figura 27 - ELISA DE COMPETIÇÃO ENTRE OS FAGOS QUE RECONHECEM pepb2a2 COM O ANTICORPO anti-b2a2. O peptídeo pepb2a2 foi imobilizado em placa de 96 poços. Adicionaram-se os fagos nas concentrações de 10^{10} TU/mL e posteriormente o anticorpo anti-b2a2 (1:150000), o conjugado anti-IgG de camundongo (1:4000) marcado com peroxidase e seu substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490 nm.

4.3 SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DO PEPTÍDEO EXPRESSO PELO CLONE 13S

A partir da análise do sequenciamento obtida para o clone 13S, verificou-se que o peptídeo expresso no capsídeo do fago possui 17 aminoácidos e, consequentemente, oriundo da biblioteca X8CX8.

A sequência peptídica do ligante identificado NMY*SP***** (dados não mostrados por motivos de patente), possui massa molecular de 1949,14 e ponto isoelétrico teórico de 6,03 deduzido utilizando o servidor ExPASy. A

sequência exibe resíduos carregados negativamente, como asparagina e glutamato (ácido glutâmico) e resíduos carregados positivamente, como arginina e lisina.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DAS FUSÕES CONJUGADAS AO BSA

De forma a melhor expor os peptídeos, estes foram conjugados à albumina bovina sérica (BSA) como proteína carreadora. A eficiência do carregamento foi constada após se verificar que houve aumento na massa molecular da BSA conjugada como ilustrado pelo gel SDS-PAGE corado com azul de Comassie (figura 28).

A obtenção de um perfil bandas não definidas, diferente daquela como a obtida com a BSA, deve-se ao fato que a cada molécula de BSA pode estar conjugada a um número diferente de peptídeos.

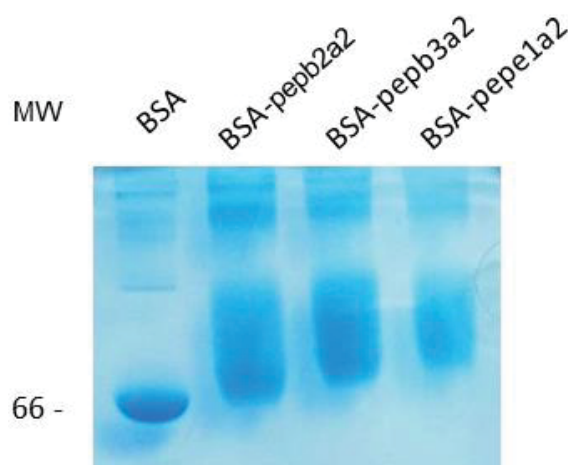


Figura 28 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO SDS-PAGE DOS PEPTÍDEOS pepb2a2, pepb3a2 E pepe1a2 CONJUGADOS À BSA. Amostras contendo 5 µg dos conjugados pepe1a2-BSA, pepb2a2-BSA e pepb3a2-BSA foram submetidas à eletroforese com SDS a 12,5%. Após a migração as bandas foram visualizadas por Coomassie-Blue. BSA foi utilizada como padrão comparativo.

4.5 CARACTERIZAÇÃO CLONE 13S, APÓS SINTESE QUÍMICA E BIOTINILAÇÃO

4.4.1 Reatividade, por ELISA, do NMY biotinilado

O peptídeo apresentado pelo clone 13S foi identificado como o mais reativo e seu DNA foi isolado para sequenciamento. O peptídeo sintético, nomeado de NMY, foi biotinilado e testado em diferentes concentrações por ELISA, na qual foi verificada uma reatividade dose-dependente (Figura 29). Neste ensaio, verifica-se uma reatividade frente ao pepb3a2, embora nenhuma reatividade frente ao pepe1a2 tenha sido observada.

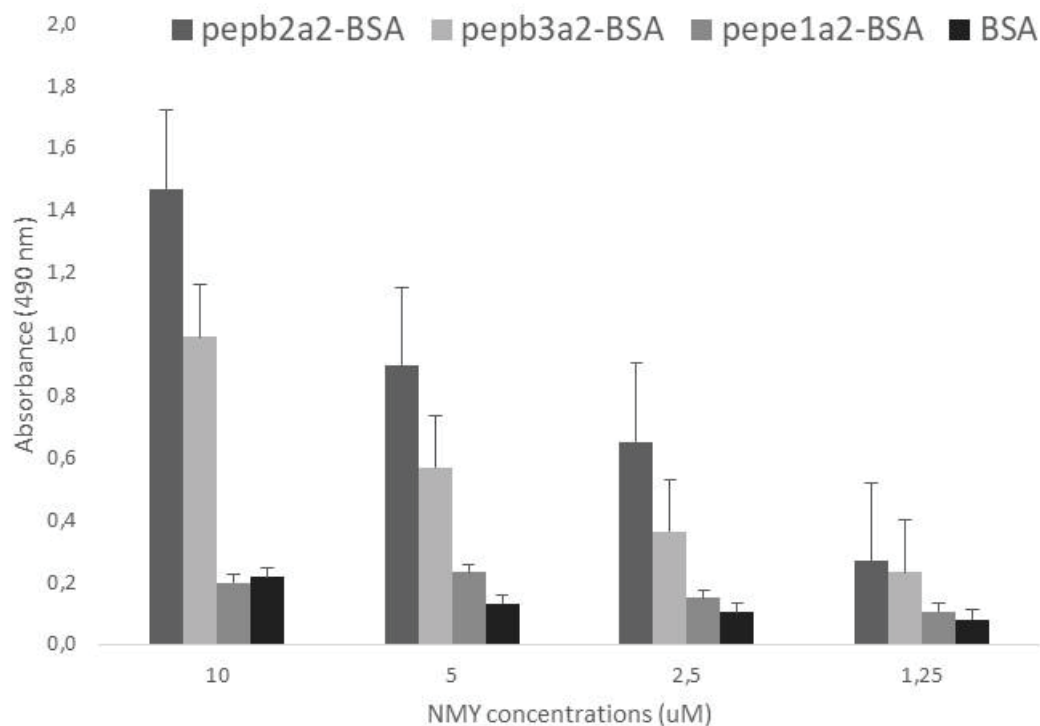


Figura 29 - ESPECIFICIDADE DO NMY BIOTINILADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AOS PEPTÍDEOS CONJUGADOS À BSA. Os peptídeos conjugados ao BSA foram imobilizados em placa de 96 poços. Diferentes concentrações do ligante NMY biotinilado foram testadas. Adicionou-se estreptavidina-HRP (1:10000) e seu o substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490 nm.

4.4.2 Ensaio de competição do NMY biotinilado com o anticorpo monoclonal

Um ensaio de competição foi realizado para verificar se o NMY seria capaz de inibir a interação com o anticorpo policlonal com o alvo pepb2a2. Na figura 30 pode-se observar que houve a redução da absorbância (linha) com diferentes concentrações do peptídeo ligante e que com 20 μ M houve a inibição em 19% (barras), corroborando os dados já mostrados por este peptídeo proveniente do clone 13S (figura 30).

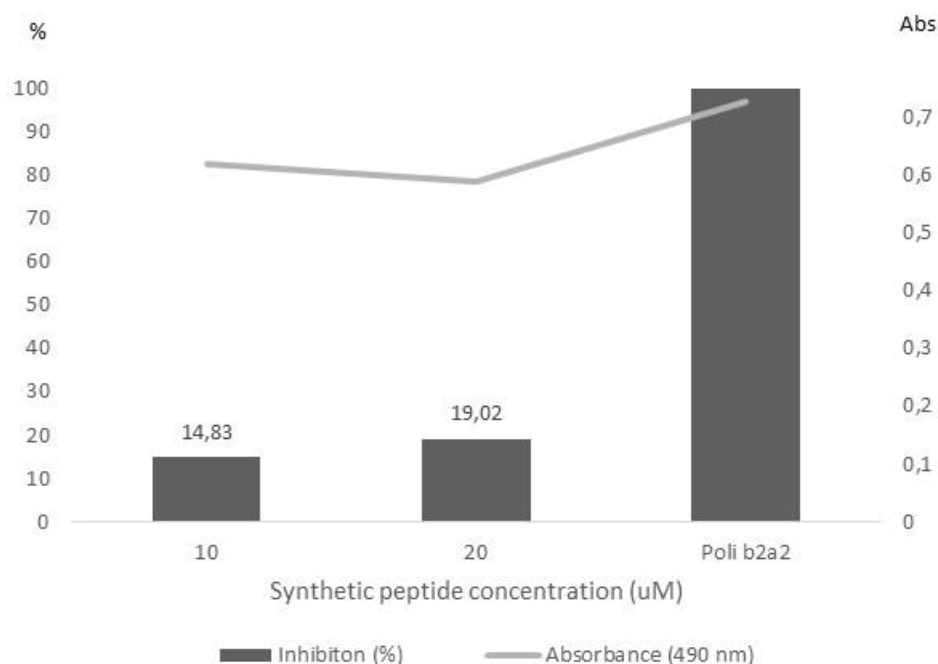




Figura 30 – ELISA COMPETIÇÃO DO PEPTÍDEO NMY EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES COM O ANTICORPO anti-b2a2. 0,3 µg/mL de pepb2a2 conjugado com BSA foi imobilizado em placa de 96 poços. O ligante NMY foi testado em diferentes concentrações previamente ao anticorpo anti-b2a2. Adicionou-se o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e seu substrato específico. A leitura da absorbância das amostras foi determinada em 490 nm.

4.5 REATIVIDADE DO NMY-FITC EM FASE SÓLIDA

A técnica de Alanina-Scan foi utilizada para caracterizar a interação do NMY-FITC com as fusões. Entretanto, esta técnica não nos possibilitou inferir se haveria algum aminoácido pontual responsável pela ligação. Os resultados mostram que, possivelmente, ocorre a interação entre todos os aminoácidos (figura 31).

É notável que a reatividade do NMY com o pepb2a2 é maior do que quando comparada às demais fusões e não há reconhecimento com as sequências de BCR e ABL1 normais (figura 31 B). Corroborando este resultado, é notável que o NMY-FITC apresenta preferência de ligação com os  correspondentes ao pepb2a2 com a coloração de Ponceau (figura 31 C). Mesmo

após a regeneração da membrana utilizando soluções contendo compostos capazes de desestabilizar as ligações, não foi possível desligar o NMY-FITC dos  Diante deste fato, não foi possível realizar o ensaio utilizando o peptídeo irrelevante conjugado à FITC (pep IR-FITC) como controle negativo.

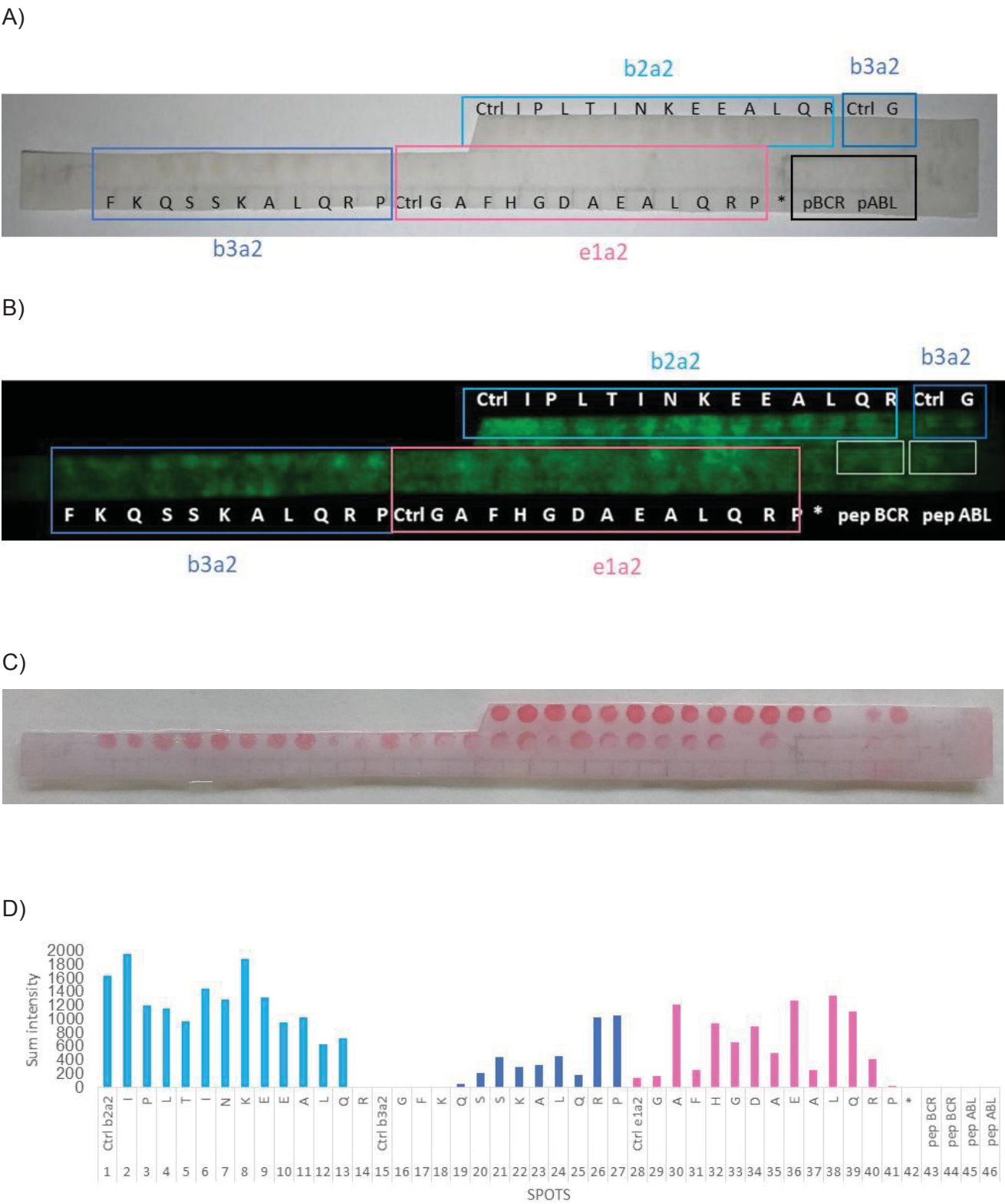


Figura 31 – MEMBRANA DE $\square\square\square\square$. A) Membrana de $\square\square\square\square$ sintetizada; B) Reatividade do NMY-FITC com os $\square\square\square\square$; C) Interação do NMY-FITC com os $\square\square\square\square$ corado com Ponceau; D) Representação gráfica da soma da intensidade de fluorescência dos $\square\square\square\square$ com o NMY-FITC.

4.6 ESTUDO DE BIOINFORMÁTICA DOS PEPTÍDEOS DAS FUSÕES

Observou-se nos ensaios anteriores diferentes reatividades na interação do NMY com os peptídeos representativos das fusões. Este fato nos instigou a realizar o alinhamento das fusões utilizando o programa Clustal O 1.2.4 multiple sequence alignment. Na figura 32 o asterisco (*) indica a presença de um resíduo conservado, ou seja, presente em todas as fusões representativas da porção ABL1. As fusões b2a2 e b3a2 apresentam muitas propriedades similares, representadas pelos pontos duplos (:) o que indica a conservação entre grupos, e b2a2 e e1a2 apresentam apenas pontos únicos (.) devido à pouca similaridade entre eles.

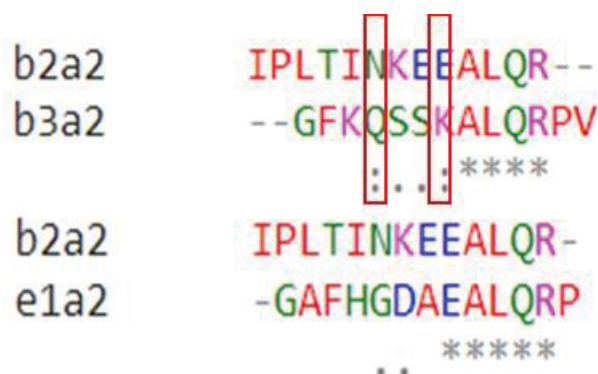


Figura 32 - SEMELHANÇA ENTRE RESÍDUOS AMINOACÍDICOS COMPARTILHADOS ENTRE OS PEPTÍDEOS. Alinhamento dos peptídeos representativos das fusões, mostrando que b2a2 e b3a2 compartilham propriedades muito similares. As caixas vermelhas destacam os aminoácidos muito similares.

Ainda, foram observadas diferenças entre as fusões quando comparados os modelos de suas estruturas conformacionais (figura 33), devido a diferença na composição aminoacídica de cada uma. Isto resulta em diferentes características quanto a propriedades físico-químicas, carga e polaridade dos resíduos juntos, justificando a diferença de interação que ocorre entre o NMY e cada uma das fusões.

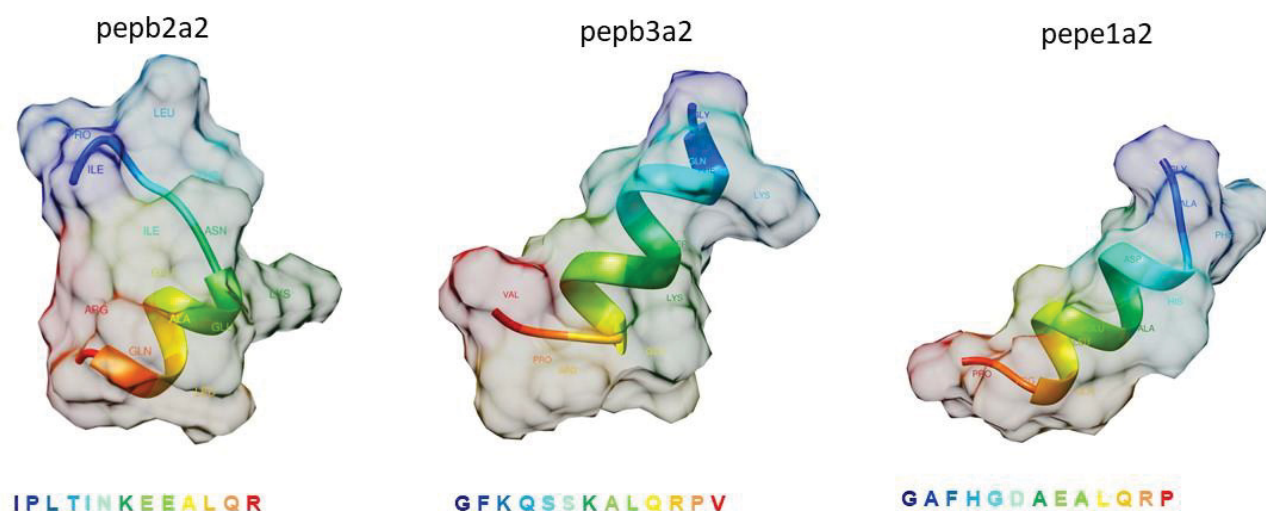


Figura 33 - MODELO DAS ESTRUTURAS CONFORMACIONAIS DOS PEPTÍDEOS. Predição dos modelos das estruturas conformacionais de pepb2a2 (A); pepb3a2 (B) and pepe1a2 (C) usando o servidor I-TASSER e CHIMERA 1.13.1rc. Os resíduos de aminoácidos estão indicados com as diferentes cores.

4.7 OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO b2a2 (Pb2a2)

4.7.1 Primeira estratégia de deleção- utilização de (38 pb)

Inicialmente foi desenhado um par de complementares (identificados como 3 e 4). A PCR de deleção utilizando o vetor P210 pcDNA de acordo com o protocolo proposto por Hanson (Hansson et al., 2008) não foi bem-sucedida mesmo em diferentes condições de reação.

4.7.2 Segunda estratégia de deleção- clonagem da região a ser mutada em vetor menor PBlueScript (PBS)

Primeiramente o inserto correspondente à região da fusão foi clonado em um vetor menor (pBlueScript) e submetido à PCR de deleção. Após a deleção, os fragmentos dos clones selecionados 1, 2 e 3 foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% juntamente ao plasmídeo original b3a2 (controle) após corte com as enzimas XbaI e HindIII . A partir deste resultado foi possível inferir que houve a deleção dos 75 pb não desejados (figura 34).

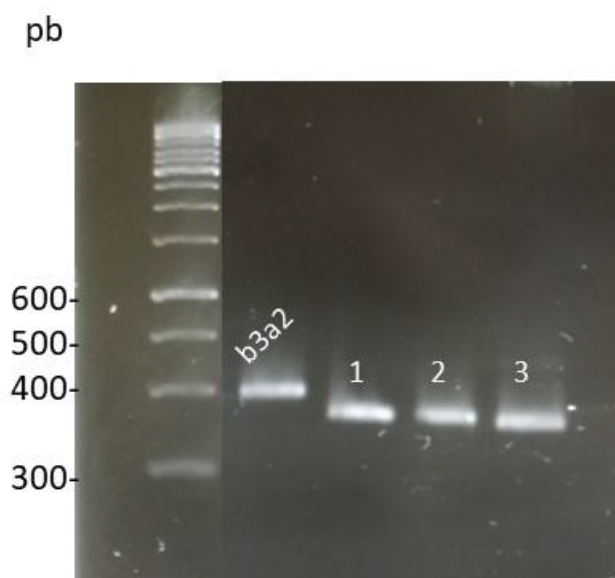


Figura 34 - PERFIL DA ELETROFORESE CORRESPONDENTES APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA. O fragmento b3a2 corresponde ao plasmídeo original (controle) e os fragmentos 1, 2 e 3 foram submetidos a PCR de deleção. Pb: Marcador de pares de bases.

No entanto a deleção só foi confirmada após obtido o resultado do sequenciamento utilizando os XbaI e HindIII (figura 35). Foi verificado o alinhamento dos complementares, confirmando a obtenção da sequência correspondente a fusão b2a2.

4.8 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE Pb2a2 EM MODELO CELULAR E SUA DETECÇÃO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A funcionalidade do vetor gerado foi verificada com a expressão da proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1} a partir da transfecção transiente do Pb2a2 em células HEK 293 T. Para tanto, essas células foram transfectadas com ambos os plasmídeos b2a2^{BCR-ABL1} e b3a2^{BCR-ABL1}.

A imunofluorescência para detecção da proteína recombinante de interesse foi realizada por um anticorpo anti-b2a2 seguido de um anticorpo anti IgG de camundongo marcado com Alexa Fluor 488, na qual foi possível marcar a proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1} visualizada na máxima projeção dos planos focais por microscopia de fluorescência (figura 37 A), não havendo reconhecimento da proteína b3a2^{BCR-ABL1}.

A transfecção transiente do Pb2a2 em eucariotos foi realizada utilizando fosfato de cálcio e Lipofectamina 2000. Não foi possível a detecção da proteína b2a2^{BCR-ABL1} a partir da transfecção com fosfato de cálcio pois esse protocolo não foi eficaz para o nosso plasmídeo em questão. Em contrapartida, a transfecção com Lipofectamina 2000 com duas diferentes concentrações de DNA plasmidial foram eficientes, apesar de ambas apresentarem porcentagem de transfecção relativamente baixa (figura 37 B). Ainda, foi avaliada a quantidade de proteína recombinante entre as duas concentrações diferentes de DNA a partir da média da intensidade de fluorescência utilizando o programa Fiji (Image J). A partir da comparação entre as quantidades de proteína expressa não foi verificada diferença significativa (figura 37 C).

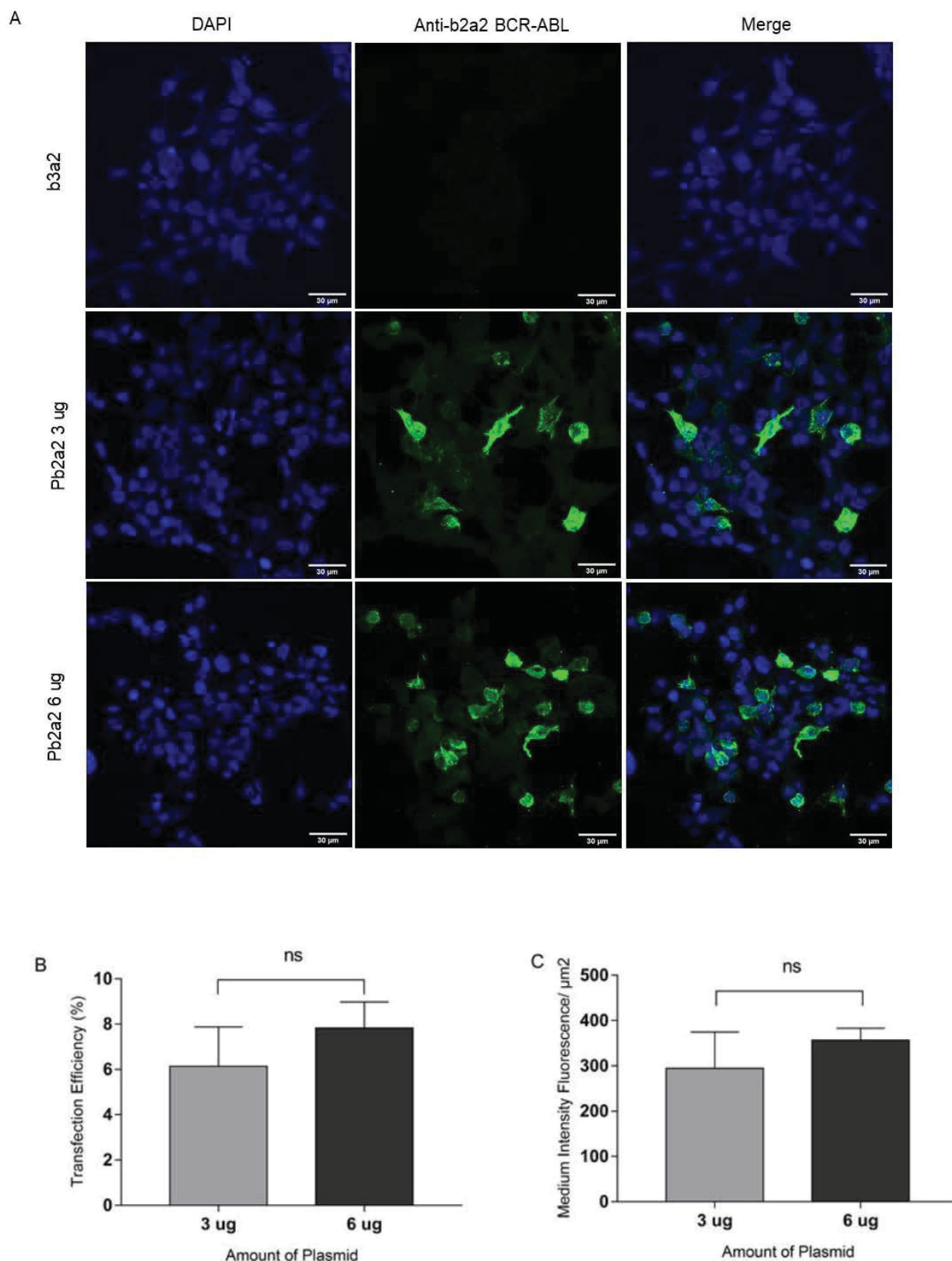



Figura 37 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE b2a2 BCR-ABL1. A) Detecção da proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1} visualizada na máxima projeção dos planos focais visualizados por microscopia de fluorescência. B) Porcentagem de eficiência de transfecção. C) Quantificação da proteína BCR-ABL1 mensurada pela média da intensidade integrada/ μm^2 no programa Fiji. ns = não significativo.

4.9 DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE b2a2 BCR-ABL1 PELO NMY-FITC EM MODELO CELULAR ATRAVÉS DA VISUALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O ligante NMY-FITC foi utilizado para detecção da proteína b2a2^{BCR-ABL1} com posterior visualização em microscopia de fluorescência. Utilizou-se um pep IR-FITC como controle negativo. Constatamos uma marcação celular inespecífica do fluoróforo FITC livre nas células HEK 293 T para ambos peptídeos, nos impossibilitando de diferenciar a marcação da proteína citoplasmática. Apesar da adaptação do protocolo utilizando diferentes concentrações e tempos de incubação, esta abordagem do ligante NMY conjugado ao FITC foi considerada ineficiente para validação deste sistema.

4.10 DETECÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE b2a2 BCR-ABL1 PELO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-b2a2 POR WESTERN-BLOTTING

Para a constatação da presença da proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1} pelo anticorpo monoclonal anti-b2a2 foi empregada a técnica de . Os extratos celulares de células HEK 293 T sem transfecção e transfectadas com os vetores correspondentes de b2a2 e b3a2 apresentaram perfil bastante semelhante. Entretanto, não foi observada a presença de uma banda diferenciada próxima de 210 kDa correspondente à proteína b2a2^{BCR-ABL1} a partir do protocolo utilizado para o preparo das amostras (figura 38).

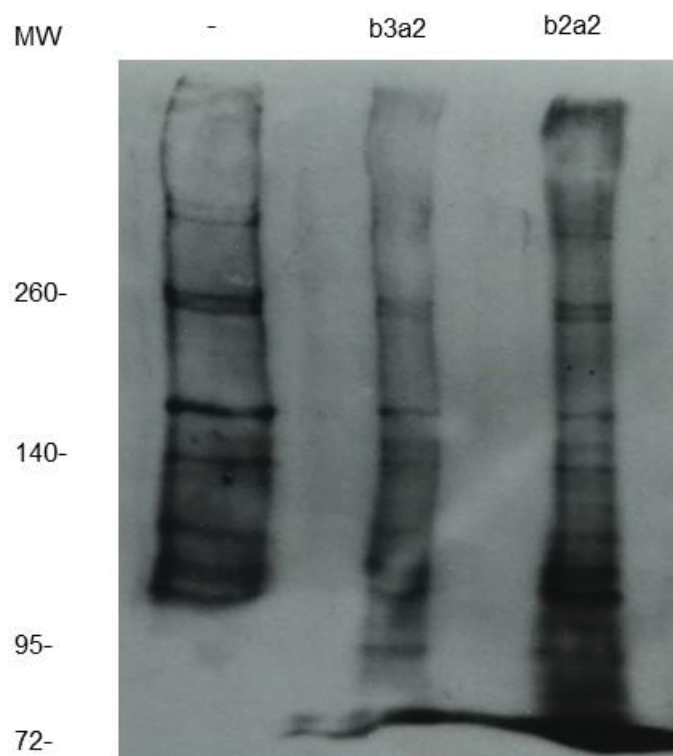


Figura 38 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS EXTRATOS CELULARES. Extratos celulares de células HEK 293 T não transfectadas (-) e transfectadas com os vetores correspondentes do b3a2 e b2a2 foram verificados por ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ utilizando-se anticorpo monoclonal anti b2a2^{BCR-ABL1} ☐

DISCUSSÃO

Atualmente a LMC é tratada com o uso de terapia dirigida e, consequente, é possível o monitoramento do tratamento de modo mais fidedigno. Desta forma, a classificação das etapas da resposta e a detecção precoce de possíveis recaídas se tornaram necessárias.

As técnicas para detecção das translocações e do cromossomo Philadelphia disponíveis são baseadas em biologia molecular e citogenética. Embora apresentem boa sensibilidade e capacidade de diferenciar o tipo da translocação, apresentam algumas limitações, principalmente no que diz a respeito da padronização pelo laboratório (Tohami et al., 2012).

A proteína BCR-ABL1 é a principal responsável pela progressão da LMC (Mughal et al., 2016) e seu grau de expressão tem sido reportado como um indicativo da progressão da doença. Este fato a torna um marcador bastante atrativo para identificar e monitorar a doença residual mínima (Frazer et al., 2000). Atualmente não estão disponíveis métodos para mensurar a concentração de proteína BCR-ABL1 e a correlação da quantidade de RNAm não corresponde fielmente à quantidade de proteína expressa (Vogel & Marcotte, 2013).

Diversos estudos têm reportado métodos adaptados para detecção da proteína BCR-ABL1, como citometria de fluxo e espectrometria de massa (Dasgupta et al., 2017; Dekking et al., 2010; Hevessy & Kappelmayer, 2012; Jilani et al., 2008; Löf et al., 2017; Weerkamp et al., 2009). Entretanto estes métodos empregam anticorpos anti-ABL1 e/ ou anti-BCR no formato captura, não sendo capazes de detectar a fusão entre BCR e ABL1 (Dasgupta et al., 2017). Desta forma, podem ocorrer falsos positivos, sendo necessário marcadores específicos para essas fusões.

O emprego dos anticorpos monoclonais como bioferramentas para diagnósticos vêm sendo amplamente utilizada em diferentes estudos (Becker et al., 2016; Jiacomini et al., 2016; Karim-Silva et al., 2016). A tecnologia dos


anticorpos monoclonais possibilita o desenvolvimento destas moléculas para diferentes alvos (Becker et al., 2016; Fogaca et al., 2019). Ainda que a produção destes para todas translocações possa ser realizada, sabe-se que o desenvolvimento destes é considerada bastante laborioso, demanda um tempo considerável até a obtenção da molécula purificada e requer a utilização de animais (Tung, 2004; Zhao et al., 2015).

Um estudo publicado na Nature mostrou que peptídeos isolados de uma biblioteca podem atuar como ligantes específicos de outros peptídeos. Ainda, tal estudo revelou que estes apresentaram interação peptídeo-peptídeo mais importante do que anticorpos monoclonais com seus epítomos e que estes ligantes peptídicos poderiam ser aplicados para detecção de uma proteína a partir de apenas um epítipo (Z. Zhang, Zhu, & Kodadek, 2000). Outras vantagens que apresentam sobre anticorpos monoclonais é o fato de que podem ser facilmente identificados e quimicamente sintetizados. Além disto, eles possibilitam a realização de modificações e/ ou substituições pontuais e a conjugação a diferentes moléculas (David et al., 2018).




Desta forma, neste presente trabalho foram selecionados diferentes peptídeos com afinidade para a região de fusão b2a2 da proteína BCR-ABL1, a junção mais comum (Castagnetti et al., 2017) apresentada por pacientes com LMC. Para tanto, foi sintetizado um peptídeo de 14 aminoácidos correspondente à fusão b2a2 (pepb2a2) o qual foi imobilizado em uma superfície para que fosse possível selecionar peptídeos ligantes específicos a partir de 4 bibliotecas randômicas de bacteriófagos (Bonnycastle et al., 1996). O aprimoramento de diferentes estratégias no processo de eluição utilizando lavagens com mudança drástica no pH seguida do processo de sonicação (Lunder, Mojca Bratkovic, Tomaz Urleb & Kreft, Samo Strukelj, 2008) permitiu a seleção de ligantes com afinidade para o pepb2a2.

O processo de eluição foi eficiente na recuperação de fagos com afinidade (De Andrade et al., 2018). Isto é sustentado pelo fato da reatividade apresentada pelos clones na concentração de 10^{10} TU/mL ser comparável ao do anticorpo monoclonal anti-b2a2 (figura 24). Além disso, os clones foram capazes de competir com o anticorpo, impedindo sua ligação ao pepb2a2 (figura 27). Da

mesma forma, outros estudos já mostraram que peptídeos apresentados por fagos foram capazes de impedir a ligação de anticorpos policlonais ao seu alvo (Fogaça et al., 2014).

O peptídeo expresso pelo clone 13S foi submetido ao sequenciamento e revelou possuir uma sequência de 17 aminoácidos: NMY*SP*****, proveniente da biblioteca X8CX8 (Bonnycastle et al., 1996). A sequência referida apresenta um motivo serina-prolina, o mesmo motivo conservado em peptídeos obtidos por  a partir de células que expressam BCR-ABL1 como alvo (Shires et al., 2014).



Além da especificidade, obtenção do peptídeo após síntese química permite inúmeras possibilidades de conjugações, com enzimas, fluorocromos e proteínas carreadoras (David et al., 2018; Sahin, Taflan, Yartas, Ashktorab, & Smoot, 2018). O peptídeo ligante (NMY) foi conjugado à biotina para amplificação do sinal de detecção por ELISA na qual manteve a afinidade com pepb2a2 mesmo após conjugação (Santana et al., 2018) (figura 29). Entretanto observou-se uma reatividade cruzada com pepb3a2, fato que pode ser justificado devido as fusões b2a2 e b3a2 compartilharem sequências conservadas na quebra (Deininger et al., 2000) (figura 29). Ainda, o NMY foi capaz de manter sua capacidade de competição com o anticorpo, mesmo possuindo uma baixa massa molecular (figura 30). Estes ensaios foram realizados utilizando os peptídeos representativos das fusões (pepb2a2, pepb3a2 e pepe1a2) conjugados à molécula carreadora BSA para favorecer uma melhor exposição do peptídeo (Santana et al., 2018).


Para a execução das análises de interação em fase-sólida foi empregado o ligante NMY conjugado a um fluorocromo (Tung, 2004). A intensidade de fluorescência verificada nos  da membrana revelaram a preferência do NMY-FITC em se ligar ao pepb2a2 do que aos demais peptídeos (figura 31). Ainda, a partir da coloração com Ponceau podemos destacar uma alta afinidade do NMY frente aos  correspondentes ao pepb2a2, pois após a regeneração da membrana utilizando soluções contendo compostos capazes de desestabilizar as ligações não foi possível retirar o NMY-FITC dos  (figura 31), nos levando a inferir que a interação existente entre peptídeo-peptídeo é

bastante estável e, como já mostrado em um estudo publicado na Nature, a interação peptídeo-peptídeo pode apresentar uma constante de equilíbrio de dissociação comparável a de um anticorpo monoclonal (Z. Zhang et al., 2000).

A reatividade frente aos demais peptídeos (pepb3a2 e pepe1a2) (figura 31), ainda que com menor intensidade, pode ser justificada devido as sequências conservadas nas regiões de quebra de b2a2 e b3a2 (Deininger et al., 2000). Além disto, verificou-se, a partir do alinhamento das sequências das fusões, que eles compartilham resíduos de aminoácidos com propriedades muito similares e semelhanças nas suas estruturas conformacionais quando analisados os ensaios de modelagem (figura 32 e 33). Já o modelo estrutural do pepe1a2 se apresenta de forma distinta aos demais, justificando sua reatividade praticamente ausente (figura 32 e 33).

Até o momento a caracterização das interações que ocorrem entre o NMY com os peptídeos das fusões obtidos não foram acertivas para elucidar os sítios responsáveis por estas interações e, concomitantemente a estes resultados, ensaios de modelagem molecular poderão ser realizados para esclarecer esta questão (Fogaca et al., 2019).

Com o intuito de verificar se o ligante NMY seria capaz de reconhecer a proteína b2a2^{BCR-ABL1}, um ensaio de detecção da proteína em um modelo celular foi realizado. Para tanto, foi necessária a construção de um plasmídeo para expressão da proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1} em eucariontes (Pb2a2). O plasmídeo Pb2a2 foi obtido utilizando um plasmídeo que expressa b3a2^{BCR-ABL1} como molde denominado de P210 pcDNA3 (He et al., 2002). Diferentes estratégias foram testadas para deleção de 75 pb do vetor molde utilizando  complementares (Hansson et al., 2008) e  (Aguiar, Oliveira, & Domingues, 2017; Söderberg & Lang, 2006). Entretanto, devido ao seu tamanho elevado (12,450 pb), foi necessária a clonagem em um vetor menor (PblueScript) para deleção por PCR. O fragmento da região deletada foi substituído no vetor molde para obtenção do plasmídeo de interesse para expressão da proteína em um vetor para eucariotos (pcDNA3).

Inicialmente a estratégia utilizando um  para a PCR de deleção foi proposta devido a esta técnica já estar

bem estabelecida para gerar mutações direcionadas a um determinado sítio e por fornecer rapidamente grandes quantidades de fragmentos de DNA desejados com apenas um único ciclo (Aguiar et al., 2017; Hansson et al., 2008; Söderberg & Lang, 2006). Entretanto, ela não foi satisfatória, possivelmente devido à técnica ser limitada a vetores com até 9,2 kb (Hansson et al., 2008). Para contornar esta situação, foi necessária a etapa de clonagem em um vetor intermediário para posterior obtenção exitosa do plasmídeo de interesse no vetor pcDNA3.

A indução da expressão da proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1} em células eucariontes foi necessária devido ao tamanho elevado do vetor (>12 kb) (J. Yang & Yang, 2017).

A linhagem celular HEK 293 T é utilizada como modelo celular para estudos de diferentes proteínas por possuir o antígeno SV40 T que permite uma alta taxa de expressão proteica quando do uso dos vetores pcDNA3.1 (Dubridge et al., 1987; Fatahi, Rahimmanesh, Mirian, Rohani, & Boshtam, 2018; Li, Ilaria, Million, Daley, & Etten, 1999; Pear, Nolan, Scott, & Baltimore, 1993). Além disso, diversos grupos utilizam esta linhagem celular por ela apresentar grande eficiência (50 - 80%) de transfecção utilizando-se fosfato de cálcio (CaPO₄) (Brondyk, 2009; Gavrilescu & Etten, 2007). Entretanto, esta estratégia não foi eficaz nas condições utilizadas nesse trabalho. Uma explicação plausível seria devido ao elevado tamanho desse vetor.

A partir das análises da transfecção transiente do Pb2a2 em células HEK 293 T padronizadas utilizando a relação de 1:2 de DNA plasmidial e a Lipofectamina 2000 verificou-se que a taxa de eficiência de transfecção se mostrou relativamente baixa. Diante disto, a quantidade de DNA plasmidial foi modificada de forma que a relação utilizada fosse de 1:1, como recomendado pelo fabricante do reagente. Entretanto a eficiência de transfecção se manteve baixa mesmo com a utilização de 2 vezes mais quantidade de DNA. Mais uma vez, é possível inferir que a dimensão do vetor seja um fator limitante para a eficácia de transfecção. Ainda, os grupos que trabalham com plasmídeos extensos utilizam a técnica de eletroporação para transfecção em células (Lesueur, Mir, & André, 2016).

A estratégia abordada utilizando a marcação da proteína b2a2^{BCR-ABL1} pelo ligante NMY-FITC não foi satisfatória. Diante disto, novas formas de validação para detecção podem ser propostas utilizando outros carreadores, dentre elas a conjugação do NMY à moléculas de biotina. O emprego do sistema biotina-estreptavidina marcada a um fluoróforo apresenta-se como uma boa alternativa pelo desta favorecer o aumento do sinal para detecção (Santana et al., 2018).




Levando-se em conta que a BCR-ABL1 é uma proteína complexa, é possível que as regiões de fusão representadas pelos peptídeos não estão expostas e são de difícil alcance para a ligação do NMY. Para isso, foi realizada a avaliação a partir da técnica de β -mercaptoetanol com a adição do β -mercaptoetanol nas amostras para a obtenção das proteínas em suas conformações primárias (He et al., 2002; Nagar et al., 2002).

O protocolo utilizado para preparo das amostras na detecção da proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1} pelo anticorpo monoclonal anti-b2a2 através do ensaio de β -mercaptoetanol não foi satisfatório, decorrente da baixa eficiência de transfecção (~7%) e consequente expressão desta proteína no extrato celular. Para melhorar a sensibilidade de detecção podem ser utilizadas técnicas de imunoprecipitação para concentrar e/ ou recuperar apenas a proteína BCR-ABL1 a partir do extrato celular (Gao et al., 2017).

Em conclusão, o β -mercaptoetanol pode ser uma boa alternativa para obtenção de ligantes peptídicos para métodos diagnósticos (Ahmed, Dhanapala, Sadli, Barrow, & Suphioglu, 2014; Z. Zhang et al., 2000) e para tratamentos (Shen, Xie, & Edwards, 2013). Esta técnica já tem sido aplicada para diagnóstico de várias doenças (Peng, Shang, Guo, He, & Wang, 2018; Sahin et al., 2018), marcadores de câncer e até mesmo leucemias (Muchima et al., 2018; Shires et al., 2014; Yu et al., 2017).

Neste trabalho, a técnica de β -mercaptoetanol foi utilizada para selecionar fagos com afinidade a outro peptídeo, sendo possível o emprego de peptídeos sintéticos como alvo (Bremnes, Lauvrak, Lindqvist, & Bakke, 1998). A partir desta estratégia, ligantes peptídicos podem ser identificados para as regiões de

interesse de uma proteína e aplicados no seu estudo, uma vez que estas sejam miniaturizadas e sintetizadas em sequências peptídicas.

Apesar de todo avanço na caracterização da LMC e do sucesso da terapia direcionada molecularmente, ainda há a necessidade da compreensão dos mecanismos envolvidos na doença, bem como o aprimoramento no tratamento e no monitoramento dos pacientes que ainda permanecem limitados (Mughal et al., 2016). Diante disso, neste trabalho desenvolvemos pela primeira vez a construção um plasmídeo para a expressão da proteína BCR-ABL1 correspondente ao transcrito b2a2 (Pb2a2). Este vetor Pb2a2 consiste em uma poderosa bioferramenta para estudos  e possibilitará a expressão e fácil obtenção de uma proteína recombinante b2a2^{BCR-ABL1} que poderá ser utilizada como padrão, seja para estudos de padronização e validação de imunoensaios, bem como amostra  destes  para validação e certificação dos ensaios.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, T. Q., Oliveira, C., & Domingues, L. (2017). Synthesis of Fusion Genes for Cloning by Megaprimer-Based PCR. In L. Domingues (Ed.), *Advances in Molecular Biology* (pp. 101–112). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5_6
- Ahmed, N., Dhanapala, P., Sadli, N., Barrow, C. J., & Suphioglu, C. (2014). Mimtags : The use of phage display technology to produce novel protein-specific probes. *Journal of Molecular Biology*, 426(2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.02.001>
- Azad, N. A., Shah, Z. A., Pandith, A. A., Khan, M. S., Rasool, R., Rasool, J., & Aziz, S. A. (2018). Prognostic Implication of BCR-ABL Fusion Transcript Variants in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Treated with Imatinib . A First of Its Kind Study on CML Patients of Kashmir, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(10), 1479–1485. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.6.1479>
- Azevedo, L., Bastos, M., Oliveira, A. P., & Boechat, N. (2017). Síntese e propriedades de fármacos inibidores da tirosina quinase Bcr-Abl, utilizados no tratamento da leucemia mieloide crônica. *Química Nova*, 40(7), 791–809.
- Baccarani, M., Deininger, M. W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J. F., ... Goldman, J. M. (2013). Review Article European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia : 2013, *Blood*, 122(6), 872–885. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501569>
- Bartholomeu, D. C., Silva, R. A., Galv, L. M. C., Sayed, N. M. A. E., Donelson, J. E., & Teixeira, S. M. R. (2003). Trypanosoma cruzi: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression q, *Journal of Molecular Biology*, 330(2), 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00034-1)
- Becker, A., Machado-de-ávila, R. A., Maciel, R., Moura, J. De, Billiald, P., Emilia, A., ... Alvarenga, L. M. (2016). Generation and characterization of monoclonal antibody against Advanced Glycation End Products in chronic kidney disease. *Journal of Molecular Biology*, 426(2), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.011>
- Bonnycastle, L. L. C., Mehroke, J. S., Rashed, M., Gong, X., & Scott, J. K. (1996). Probing the Basis of Antibody Reactivity with a Panel of Constrained Peptide

Libraries Displayed by Filamentous Phage, 747–762.

Borgia, K., Pagnano, B., Miranda, E. C., Delamain, M. T., Duarte, G. O., Paula, E. V. De, ... Souza, C. A. De. (2017). Influence of BCR-ABL Transcript Type on Outcome in Patients With Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Treated With Imatinib. *Journal of Clinical Medicine*, 6(11), 728–733. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2017.06.009>

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Journal of Biological Chemistry*, 252, 248–254.

BRASIL. (2014). Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia.

Bremnes, T., Lauvrak, V., Lindqvist, B., & Bakke, O. (1998). Selection of phage displayed peptides from a random 10-mer library recognising a peptide target, *Journal of Molecular Biology*, 281(1380), 21–28.

Brondyk, W. H. (2009). *Immunology and Pathology of Infectious Diseases* (1st ed., Vol. 463). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63011-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63011-1)

Capelli-peixoto, J., Chávez-olórtegui, C., Chaves-moreira, D., Carlos, J., Gabardo, J., Nayara, K., ... Moura, J. De. (2011). Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis, *Vaccine*, 29, 9473–9479. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.10.027>

Castagnetti, F., Iurlo, A., Gugliotta, G., Breccia, M., Levato, L., Albano, F., ... Martinelli, C. (2017). The BCR-ABL1 transcript type influences response and outcome in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib, (February), 797–805. <https://doi.org/10.1002/ajh.24774>

Daley, G. Q., Erren, R. A. V. A. N., & Baltimore, D. (1989). Induction of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice by the 210 gene of the Philadelphia Chromosome. *Journal of Virology*, 63, 1000–1004.

Darocho, W. D., Silva, A. E. R. A., Bartholomeu, D. C., Pires, A. E. S. F., Freitas, J. M., Macedo, A. A. M., ... Levin, A. E. M. J. (2004). Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols, 113–120. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1004-5>

Dasgupta, S., Ray, U. K., Mitra, A. G., Bhattacharyya, D. M., Mukhopadhyay, A., Das,

- P., ... Mukhopadhyay, S. (2017). Evaluation of a new flow cytometry based method for detection of BCR-ABL1 fusion protein in chronic myeloid leukemia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(2), 112–118. <https://doi.org/10.5045/br.2017.52.2.112>
- David, M., Masse, M., Faucon, A., Abouzid, K., E, P., Gaudin, N., ... Khrestchatisky, M. (2018). Identification and characterization of highly versatile peptide-vectors that bind non- competitively to the low-density lipoprotein receptor for in vivo targeting and delivery of small molecules and protein cargos, 1–30.
- De Andrade, C., Yamanaka, I., Schlichta, L. S., Karim, S., Picheth, G. F., Felipe, L., ... Magalhães, L. (2018). Physicochemical and immunological characterization of chitosan-coated bacteriophage nanoparticles for in vivo mycotoxin modeling. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 36(December 2017), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.063>
- Deininger, M. W. N., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). Review article The molecular biology of chronic myeloid leukemia, *Journal of Clinical Investigation*, 105(10), 3343–3357.
- Dekking, E., Velden, V. H. J. Van Der, Böttcher, S., Brüggemann, M., Sonneveld, E., Boeckx, N., ... Dongen, J. J. M. Van. (2010). Best Practice & Research Clinical Haematology Detection of fusion genes at the protein level in leukemia patients via the flow cytometric immunobead assay, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 25(September 2010), 333–345. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2010.09.010>
- Dubridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. A. N. C., Leong, P., Miller, J. H., & Calos, M. P. (1987). Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System, *Journal of Virology*, 59(1), 379–387.
- Ercaliskan, A., & Eskazan, A. E. (2018). The Impact of BCR-ABL1 Transcript Type on Tyrosine Kinase Inhibitor Responses and Outcomes in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. <https://doi.org/10.1002/cncr.31408>
- Farhat-maghribi, S., Habbal, W., & Monem, F. (2016). Frequency of BCR-ABL Transcript Types in Syrian CML Patients, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 31(1), 1–6.
- Fatahi, A., Rahimmanesh, I., Mirian, M., Rohani, F., & Boshtam, M. (2018). Construction and characterization of human embryonic kidney- (HEK) -293T cell overexpressing truncated $\alpha 4$ integrin, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 33(January), 353–359.
- Fogaca, R. L., Alvarenga, L., Woiski, T., Becker-Finco, A., Teixeira, K., Silva, S., ... Moura, De, J. (2019). Biomolecular engineering of antidehydroepiandrosterone

antibodies : a new perspective in cancer diagnosis and treatment using single-chain antibody variable fragment, □□, 689–705.

Fogaça, R. L., Capelli-peixoto, J., Yamanaka, I. B., Almeida, R. P. M. De, Muzzi, J. C. D., Borges, M., ... Moura, J. De. (2014). Phage-displayed peptides as capture antigens in an innovative assay for *Taenia saginata* -infected cattle, 8887–8894. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5968-0>

Frank, R. (2002). The SPOT-synthesis technique Synthetic peptide arrays on membrane supports — principles and applications, □□□, 13–26.

Frazer, R., Irvine, A. E., & McMullin, M. F. (2007). Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century, □□(1), 8–17.

Gao, M., Huang, Z., Tao, K., Xiao, Q., Wang, X., & Cao, W. (2017). Depression of oncogenicity by dephosphorylating and degrading, □(2), 3304–3314.

Gavrilescu, L. C., & Etten, R. A. Van. (2007). Production of Replication-Defective Retrovirus by Transient Transfection of 293T cells, 6–7. <https://doi.org/10.3791/550>

Hansson, M. D., Rzeznicka, K., Rosenba, M., Hansson, M., & Sirijovski, N. (2008). PCR-mediated deletion of plasmid DNA, □□□, 373–375. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.12.005>

Hantschel, O., & Superti-furga, G. (2004). REGULATION OF THE C-ABL AND BCR – ABL TYROSINE KINASES, □(January). <https://doi.org/10.1038/nrm1280>

He, Y., Wertheim, J. A., Xu, L., Miller, J. P., Karnell, F. G., Choi, J. K., ... Pear, W. S. (2002). The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia – like disease by bcr / abl, □□(8), 2957–2969.

Hevessy, Z., & Kappelmayer, J. (2012). Laboratory evaluation of a fl ow cytometric BCR-ABL immunobead assay, □□(4), 689–692. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.834>

Höglund, M., Sandin, F., & Simonsson, B. (2015). Epidemiology of chronic myeloid leukaemia : an update, □□ <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2314-2>

Hong, S., Kim, I., Kang, H., Yoon, S., & Kim, D. (2014). Detection and quantification of the Bcr / Abl chimeric protein on biochips using LDI-TOF MS †, 4831–4834. <https://doi.org/10.1039/c4cc01332h>

Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2018). ANNUAL CLINICAL UPDATES IN

- HEMATOLOGICAL Chronic myeloid leukemia : 2018 update on diagnosis , therapy and monitoring, (December 2017), 442–459. <https://doi.org/10.1002/ajh.25011>
- Jacomini, I., Silva, S. K., Aubrey, N., Muzard, J., Chavez-olortegui, C., Moura, J. De, ... Alvarenga, L. M. (2016). Immunodetection of the “ brown ” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotxin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. *Immunology Letters*, 180, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.03.001>
- Jilani, I., Kantarjian, H., Faraji, H., Gorre, M., Cortes, J., Ottmann, O., ... Albitar, M. (2008). An immunological method for the detection of BCR-ABL fusion protein and monitoring its activation, *Leukemia*, 22, 936–943. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.11.023>
- Karim-Silva, S., Moura, J. De, Noiray, M., Carlos, J., Aubrey, N., Alvarenga, L. M., & Billiald, P. (2016). Generation of recombinant antibody fragments with toxin-neutralizing potential in loxoscelism. *Immunology Letters*, 180, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.05.019>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Journal of Molecular Biology*, 60, 680–685.
- Lesueur, L. L., Mir, L. M., & André, F. M. (2016). Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. *Journal of Microencapsulation*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/02653733.2016.1134444>
- Li, B. S., Ilaria, R. L., Million, R. P., Daley, G. Q., & Etten, R. A. Van. (1999). The P190, P210, and P230 Forms of the BCR/ABL Oncogene Induce a Similar Chronic Myeloid Leukemia – like Syndrome in Mice but Have Different Lymphoid Leukemogenic Activity, *Leukemia*, 13(9), 1399–1408.
- Löf, L., Arngården, L., Olsson-strömberg, U., Siart, B., Jansson, M., Dahlin, J. S., ... Rosenquist, R. (2017). Flow Cytometric Measurement of Blood Cells with BCR-ABL1 Fusion Protein in Chronic Myeloid Leukemia, (December 2016), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00755-y>
- Lunder, Mojca Bratkovic, Tomaz Urleb, U., & Kreft, Samo Strukelj, B. (2008). Ultrasound in phage display : A new approach to nonspecific elution Short Technical Reports Ultrasound in phage display: a new approach to nonspecific elution, (July). <https://doi.org/10.2144/000112759>
- Mes-masson, A., Mclaughlin, J., Daley, G. Q., Paskindt, M., & Witte, O. N. (1986).

- Overlapping cDNA clones define the complete coding region for the P210c-abl gene product associated with chronic myelogenous leukemia cells containing the Philadelphia chromosome, *Cell* (December), 9768–9772.
- Muchima, K., Todaka, T., Shinchu, H., Sato, A., Tazoe, A., Aramaki, R., ... Suda, Y. (2018). Development of sugar chain-binding single-chain variable fragment antibody to adult T-cell leukemia cells using glyco-nanotechnology and phage display method, *Antibodies* (4), 281–291. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy005>
- Mughal, T. I., Radich, J. P., Deininger, M. W., Apperley, J. F., Hughes, T. P., Harrison, C. J., ... Daley, G. Q. (2016). Chronic myeloid leukemia: Reminiscences and dreams. *Journal of Clinical Investigation*, 126(5), 541–558. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.139337>
- Nagar, B., Bornmann, W. G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D. R., Miller, W. T., ... Kuriyan, J. (2002). Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571) 1, *Science* (8), 4236–4243.
- Nørholm, M. H. H. (2010). A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., & Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection, *Cell* (September), 8392–8396.
- Pendergast, A. M. (2002). The Abl Family Kinases : Mechanisms of Regulation and Signaling, 2002.
- Peng, L., Shang, W., Guo, P., He, K., & Wang, H. (2018). Phage Display-Derived Peptide-Based Dual- Modality Imaging Probe for Bladder Cancer Diagnosis and Resection Postinstillation : A Preclinical Study, *Antibodies* (October), 2100–2112. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0212>
- Raspadori, D., Pacelli, P., Sicuranza, A., Abruzzese, E., Iurlo, A., Cattaneo, D., ... Bocchia, M. (2019). Flow Cytometry Assessment of CD26 + Leukemic Stem Cells in Peripheral Blood : A Simple and Rapid New Diagnostic Tool for Chronic Myeloid Leukemia, (January). <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21764>
- Recchia, A. G., Caruso, N., Bossio, S., Pellican, M., De, L., Franzese, S., ... Morabito, F. (2015). Flow Cytometric Immunobead Assay for Detection of BCR-ABL1 Fusion Proteins in Chronic Myeloid Leukemia: Comparison with FISH and PCR

- Techniques, (ii), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130360>
- Roskoski, R. (2003). STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor, *BBRC*, 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.055>
- Sahin, D., Taflan, S. O., Yartas, G., Ashktorab, H., & Smoot, D. T. (2018). Screening and Identification of Peptides Specifically Targeted to Gastric Cancer Cells from a Phage Display Peptide Library, *APJCP*, 19, 927–932. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.4.927>
- Santana, J. F. De, Mariângela, R. B., Picheth, G. F., Yamanaka, I. B., Fogaça, R. L., Thomaz-soccol, V., ... Rita, M. (2018). Talanta Engineered biomarkers for leprosy diagnosis using labeled and label-free analysis. *Talanta*, 180(May), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.027>
- Shen, D., Xie, F., & Edwards, W. B. (2013). Evaluation of Phage Display Discovered Peptides as Ligands for Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA), *PLOS ONE*, 8(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068339>
- Shires, K., Shankland, I., Mowla, S., Njikan, S., Jaymacker, J., & Novitzky, N. (2014). Serine and proline-rich ligands enriched via phage-display technology show preferential binding to BCR/ABL expressing cells. *Blood*, 123(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2014.01.001>
- Smith, G. P. (1985). Filamentous Fusion Phage : Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Gene*, 54(1985).
- Söderberg, M., & Lang, M. A. (2006). Megaprimer-Based Methodology for Deletion of a Large Fragment Within a Repetitive Polypyrimidine-Rich DNA, *Nucleic Acids Res*, 34, 1–10.
- Team, T. A. C. S. medical and editorial content. (2018). About Chronic Myeloid Leukemia What Is Chronic Myeloid Leukemia ? *BMJ*, 360(March), 1–10.
- Tohami, T., Nagler, A., & Amariglio, N. (2012). Laboratory Tools for Diagnosis and Monitoring Response in Patients with Chronic Myeloid Leukemia, *Leukemia*, 26(august), 501–507.
- Tung, C. (2004). Fluorescent Peptide Probes for In Vivo Diagnostic, *Biochim Biophys Acta*, 1687, 391–403. <https://doi.org/10.1002/bip.20139>
- Villard, S., Piquer, D., Raut, S., Le, J., & Granier, C. (2002). Low Molecular Weight Peptides Restore the Procoagulant Activity of Factor VIII in the Presence of the

- Potent Inhibitor Antibody ESH8 *, *□□□*(30), 27232–27239.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M203415200>
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2013). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses, *□□*(4), 227–232.
<https://doi.org/10.1038/nrg3185>.Insights
- Weerkamp, F., Dekking, E., Ng, Y. Y., Velden, V. H. J. Van Der, Wai, H., & Bo, S. (2009). Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR – ABL fusion proteins in leukemia patients, 1106–1117. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.93>
- Wertheim, J. A., Miller, J. P., Xu, L., He, Y., & Pear, W. S. (2002). The biology of chronic myelogenous leukemia: mouse models and cell adhesion, 8612–8628.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206089>
- Wolff, N. C., & Jr, R. L. I. (2001). Establishment of a murine model for therapy-treated chronic myelogenous leukemia using the tyrosine kinase inhibitor STI571, *□□*(9), 2808–2817.
- Yang, J., & Yang, Y. (2017). Plasmid size can affect the ability of Escherichia coli to produce high-quality plasmids, (2012), 2017–2022. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0994-4>
- Yang, T., Eissler, C. L., Hall, M. C., & Parker, L. L. (2013). A Multiple Reaction Monitoring (MRM) Method to Detect Bcr-Abl Kinase Activity in CML Using a Peptide Biosensor, *□*(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056627>
- Yu, D., Du, Z., Li, W., Chen, H., Ye, S., Hoffman, A., ... Hu, J.-F. (2017). Targeting Jurkat T Lymphocyte Leukemia Cells by an Engineered Interferon-Alpha Hybrid Molecule, *□□□□□*, 519–529. <https://doi.org/10.1159/000477601>
- Zhang, B. X., & Ren, R. (1998). Bcr-Abl Efficiently Induces a Myeloproliferative Disease and Production of Excess Interleukin-3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Mice: A Novel Model for Chronic Myelogenous Leukemia. *□□□□*, 3829–3841.
- Zhang, Z., Zhu, W., & Kodadek, T. (2000). Selection and application of peptide-binding peptides, (April). <https://doi.org/10.1038/71951>
- Zhao, N., Pei, S., Qi, J., Zeng, Z., Iyer, S. P., Lin, P., ... Zu, Y. (2015). Oligonucleotide aptamer-drug conjugates for targeted therapy of acute myeloid leukemia.

□□□ □□□□□□, □□, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.025>

Zheng, W. W. C., Liu, Z., Zhao, C. B., Xu, G. L. Z., & Wang, Z. J. C. H. (2018). Droplet digital PCR for BCR / ABL (P210) detection of chronic myeloid leukemia : A high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression, (April), 291–296. <https://doi.org/10.1111/ejh.13084>